

ANDRESA PRISCILA DE SOUZA RAMOS

**Estudo de bactérias potencialmente promotoras de  
crescimento em *Citrus sp.***

RECIFE-PE

Fevereiro de 2016

ANDRESA PRISCILA DE SOUZA RAMOS

**Estudo de bactérias potencialmente promotoras de  
crescimento em *Citrus sp.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

**Orientadora:** Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

**Conselheiros:** Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas  
Dr. Walter dos Santos Soares Filho

RECIFE-PE

Fevereiro de 2016

Ficha catalográfica

C837a Ramos, Andresa Priscila de Souza  
Estudo de bactérias potencialmente promotoras de  
crescimento em Citrus sp. / Andresa Priscila de Souza  
Ramos. – Recife, 2016.  
110 f. : il.

Orientadora: Carolina Etienne de Rosália e Silva  
Santos.

Tese (Programa de Pós-graduação em Ciências do  
Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento de Agronomia, Recife, 2016.

Referências.

1. Auxina 2. Amilase 3. Rizosfera 4. Porta-Enxerto  
5. Solubilização I. Santos, Carolina Etienne de Rosália e  
Silva, orientador II. Título

CDD 631.4

ANDRESA PRISCILA DE SOUZA RAMOS

**Estudo de bactérias potencialmente promotoras de  
crescimento em *Citrus sp.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

**Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 29 de fevereiro de  
2016**

Orientadora:

Dra Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

Examinadores:

Dr. Newton Pereira Stamford

Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Dr. Felipe José Cury Fracetto

Dr. Dário Costa Primo

## DEDICATÓRIA

*A minha querida **Tia Néia**, que agora está em um lugar muito distante, mas sempre nos lembraremos da sua alegria, da sua vontade de viver, de lutar sempre, e principalmente de nunca desistir diante de qualquer adversidade ....  
Você faz muita falta, mas estará sempre nos nossos corações!*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus ou a Força Divina Superior, que rege o mundo por seus caminhos, que por mais que pareçam obscuros, sempre nos apresenta uma luz no final.

Aos meus pais, M<sup>a</sup> Laudecí de S. Ramos e Antônio Ramos Neto, pelo amor a mim dedicado, pelos ensinamentos transferidos, por me darem a oportunidade de crescer e me dedicar aos estudos, por sempre acreditarem em mim incondicionalmente.

A Airon, meu esposo, que aguentou todas as crises que todo aluno de doutorado tem, com toda paciência e amor, entendeu os períodos e ausência e me ajudou infinitamente durante as etapas mais árduas do trabalho.

A Tia Néia, que me mostrou o mundo de uma forma que só ela enxergava e deixou isso como legado para nós que aqui ficamos. Pensar nela todos os dias me faz querer ser uma pessoa melhor.

A minha família, por tudo, até por perdoarem minha constante ausência, principalmente a minha Irmã Angélica e a Tia Cleide, amiga para todos os momentos.

Ao Pesquisador Dr. Antônio da Silva Souza, pelos ensinamentos, pela amizade, pela paciência e pela curiosidade científica sempre aberta a novas possibilidades, um dos presentes que Cruz das Almas me deu.

A Profa Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, pela orientação e ensinamentos passados, pelo auxílio prestado e pela amizade e disponibilidade em auxiliar a resolver os problemas e por não desistir de me orientar.

Aos coorientadores, Dra Ana Dolores Santiago de Freitas e Dr. Walter dos Santos Soares Filho, pelas orientações e auxílio.

Aos amigos Adelazil e Renato, que sempre estiveram presentes na minha vida, a amizade que permanece duradoura e pelas discussões enriquecedoras, e mesmo com a distância, as mesmas as vezes acontecessem via Whatsap.

Aos amigos conquistados na PGCS: Danúbia, Emmanuele, Wagner, e Monalisa, Cybelle, Jean, pelos momentos de descontração e conversas científicas ou não.

A equipe que forma o LBM/ NBA da Embrapa Mandioca e Fruticultura, na pessoa de Raimundo e Vandeson, sem a dedicação, auxílio e amizade deles, parte deste trabalho não seria realizada. Também agradeço aos estagiários do Laboratório, pelos momentos de descontração, resenhas e mesmo pelos

perrengues, pois são com eles que aprendemos todos os dias. Na pessoa de Cátia, Claudinha, Paulo Henrique Zanon, Paulo, que sempre estiveram à disposição para ajudar, discutir e pela amizade e pelos inúmeros momentos de descontração. Vocês ajudaram a manter minha sanidade. Também ao Rafael (Mineiro) e a boa vontade desprendida desde o início em ajudar as pessoas

A Karen, Carla e Rafaele, amigas de longa data ou presentes que Cruz das Almas me deu, tanto faz, só sei que agradeço pela paciência, ajuda com o trabalho, amizade e devo também a vocês bons momentos de risada solta.

A Leandro, analista do laboratório de Fitopatologia, Jaciene, Analista do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, e Luciano, Analista do laboratório de Microbiologia do Solo pela boa vontade, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo empréstimo de materiais sem data para devolução, pelas dicas nos trabalhos, pois sem o auxílio deles, outra parte deste trabalho também não seria concluído.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos ensinamentos repassados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de afirmar o meu amor por novas descobertas e pela pesquisa científica.

À Socorro (Help) que está sempre pronta para nos auxiliar e pelo carinho desprendido a nós, alunos de pós-graduação, algumas vezes desesperados.

A UFRPE pela oportunidade de ingressar na Profissão de Engenheira Agrônoma e pelo que aprendi a cultivar por esta profissão tão bonita e com campo de trabalho tão amplo.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, por me dar a oportunidade de realizar o trabalho nas suas dependências, e por me fazer aprender tantas coisas que nunca pensei que fosse aprender e pelas pessoas que me deu a oportunidade de conhecer e continua a me dar a mesma oportunidade todos os dias.

A FACEPE pela concessão da Bolsa de estudos no primeiro ano do doutorado.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram neste trabalho, que não foram poucas, meu mais sincero agradecimento!!!! Me tornaram uma pessoa melhor, pois me mostraram que sempre podemos contar com pessoas de bom coração nos momentos em que mais precisamos. Sempre tentarei passar isso para frente.

***OBRIGADA!!!!!!***

## SUMÁRIO

Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	02
2.1 A cultura dos Citros	02
2.2 Interação planta-micro-organismo	03
2.3 Bactérias endofíticas associadas as plantas	03
2.4 Bactérias rizosféricas associadas as plantas	05
2.5 Propriedades benéficas da interação planta/bactéria	08
2.6 Produção de Ácido Indol Acético por BPCP	09
2.7 Solubilização de Fosfato Inorgânico por BPCP	10
2.8 Produção de sideróforos por BPCP	12
2.9 Fixação de biológica de nitrogênio por BPCP	13
2.10 Produção de enzimas por BPCB	15
2.11 BPCP e o potencial de Controle Biológico	16
2.12 Diversidade genética de bactérias promotoras do crescimento de plantas	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
3.1 Coleta de amostras	20
3.2 Isolamento de bactérias endofíticas	23
3.3 Produção de enzimas de importância biotecnológica	24
3.4 Produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas	25
3.5 Caracterização molecular dos isolados	27
3.6 Análises estatísticas	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	32
4.1 Isolamento	32
4.2 Produção de enzimas de importância biotecnológica	40
4.3 Produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas	59
4.4 Caracterização Molecular	77
<b>5. CONCLUSÕES</b>	80
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	81



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de solos da CNPMF. Área do BAG de citros indicada com seta vermelha. Fonte: Souza e Souza, 2001. **22**
- Figura 2.** Distribuição dos isolados bacterianos encontrados em relação a A) Morfologia da colônia e B) Coloração da colônia. **32**
- Figura 3.** Distribuição dos isolados bacterianos em relação aos nichos de isolamento. Foram avaliadas A) Morfologia da colônia e B) Coloração da colônia. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos de isolamento ( $p < 0,05$ ). **33**
- Figura 4.** Distribuição dos isolados bacterianos em relação a combinação genótipo e porta-enxerto. Foram avaliadas **A)** Morfologia da colônia e **B)** Coloração da colônia. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência da combinação entre genótipo e porta-enxerto ( $p < 0,05$ ). **34**
- Figura 5.** Distribuição dos isolados bacterianos em relação ao local de coleta das amostras. Foram avaliadas a **A)** Morfologia da colônia e **B)** Coloração da colônia. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos locais de coleta ( $p < 0,05$ ). **34**
- Figura 6.** Médias da densidade bacteriana em relação ao **A)** nicho de isolamento; **B)** Genótipo; **C)** Local de coleta e **D)** Porta-enxerto. Médias de três repetições. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ). **36**
- Figura 7.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de enzimas em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos na frequência de bactérias positivas para a produção de enzimas ( $p < 0,05$ ). **41**
- Figura 8.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de enzimas em relação a combinação de genótipo e porta-enxerto do qual foram isoladas A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência das combinações de genótipos e porta-enxertos na **42**

frequência de bactérias positivas para a produção de enzimas ( $p < 0,05$ ).

- Figura 9.** Índice Enzimático amilolítico médio (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ). **43**
- Figura 10.** Índice Enzimático amilolítico médio (mm) produzido em relação a combinação genótipo e porta-enxerto para atividade amilolítica. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ). **44**
- Figura 11.** Índice Enzimático celulolítico médio (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ). **47**
- Figura 12.** Índice Enzimático celulolítico médio (mm) produzido em relação a combinação genótipo e porta-enxerto para atividade celulolítica. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ). **48**
- Figura 13.** Índice Enzimático médio para pectato liase e poligalacturonase (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que não houve influência do nicho de isolamento ( $p > 0,05$ ). **52**
- Figura 14.** Índice Enzimático médio para pectato liase e poligalacturonase (mm) produzido em relação a combinação genótipo e porta-enxerto. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ). **53**
- Figura 15.** Distribuição das linhagens bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). **59**
- Figura 16.** Distribuição das linhagens bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico em relação ao genótipo do qual foram **60**

isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos genótipos ( $p < 0,05$ ).

- Figura 17.** Índice de Solubilização de fosfato (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskall-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). **61**
- Figura 18.** Índice de Solubilização de fosfato (mm) produzido em relação as combinações genótipo e porta-enxerto. A análise pelos testes de Kruskall-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ). **61**
- Figura 19.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de ácido indol acético dependente de L-triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). **66**
- Figura 20.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de ácido indol acético dependente de L-triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos genótipos ( $p < 0,05$ ). **66**
- Figura 21.** Influência do nicho de colonização bacteriana sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si. A análise pelos testes de Kruskall-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). **67**
- Figura 22.** Influência da combinação genótipo e porta-enxerto sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si. A análise pelos testes de Kruskall-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). **67**
- Figura 23.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com o nicho de colonização sobre a potencial fixação biológica de nitrogênio atmosférico. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). **71**
- Figura 24.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com o genótipo do hospedeiro sobre a potencial fixação biológica de **71**

nitrogênio atmosférico. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

- Figura 25.** Distribuição das linhagens bacterianas positivas para a fixação biológica de nitrogênio, de acordo com o meio de cultura. **72**
- Figura 26.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com o nicho de colonização sobre a produção de sideróforos. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). **74**
- Figura 27.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com genótipo hospedeiro sobre a produção de sideróforos. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos genótipos ( $p < 0,05$ ). **75**
- Figura 28.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens bacterianas associadas a plantas híbridas de citros, com base nas sequências obtidas pelo *primer* BOX A1R, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **79**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Lista dos genótipos híbridos selecionados e localização no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.	<b>21</b>
<b>Tabela 2.</b>	Características químicas de Latossolo Amarelo onde se localiza do BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura	<b>22</b>
<b>Tabela 3.</b>	Média da densidade bacteriana isolados de quatro diferentes nichos de colonização de 13 combinações de genótipo e porta-enxerto.	<b>39</b>
<b>Tabela 4.</b>	Índice Enzimático para a produção de amilase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citro	<b>45</b>
<b>Tabela 5.</b>	Índice Enzimático para a produção de celulase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros.	<b>49</b>
<b>Tabela 6.</b>	Índice Enzimático para a produção de poligalacturonase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros, cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura.	<b>54</b>
<b>Tabela 7.</b>	Índice Enzimático para a produção de pectato liase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros, cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura.	<b>56</b>
<b>Tabela 8.</b>	Média dos Índices de Solubilização para a solubilização de fosfato inorgânico por isolados bacterianos da rizosfera e endofíticas de raízes, caules e folhas de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros, cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura.	<b>63</b>

<b>Tabela 9.</b>	Média da Quantificação da produção ácido indol acético via dependente de triptofano por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 genótipos híbridos de porta enxerto de citros, cultivados na Embrapa Mandioca e Fruticultura.	<b>69</b>
<b>Tabela 10.</b>	Distribuição dos isolados positivos para formação da película de indicação de fixação de nitrogênio, cultivadas em quatro tipos de meio de cultura semissólido livre de nitrogênio.	<b>73</b>
<b>Tabela 11.</b>	Distribuição dos isolados positivos produção de sideróforos cultivadas em meio CAS sólido .	<b>76</b>

## RESUMO

### **Estudo de bactérias potencialmente promotoras de crescimento em *Citrus sp.***

Bactérias promotoras de crescimento de plantas mostram mecanismos benéficos que podem promover o melhor desenvolvimento da planta hospedeira. A interação entre hospedeiro e bactéria pode ser afetada por diversos fatores, como o genótipo da planta, a espécie, e o nicho do qual o micro-organismo foi originado. A cultura dos citros tem grande importância socioeconômica para o país, que é um dos maiores produtores e exportadores dos frutos. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram estudar a comunidade bacteriana associada a diferentes genótipos híbridos de citros, observar a densidade bacteriana associada a diferentes nichos e avaliar a potencial capacidade de se tornarem futuros inoculantes para a cultura, através do estudo da produção de substâncias promotoras de crescimento, e avaliar a diversidade genética através do BOX-PCR. Foram estudados isolados bacterianos dos nichos rizosfera, raízes, caules e folhas de 13 diferentes genótipos de híbridos de porta-enxertos de citros e avaliada sua capacidade de produção das enzimas amilase, celulase, pectinases (poligalacturonase e pectato liase), solubilização de fosfato inorgânico, produzir AIA via dependente de triptofano, a potencial fixação biológica de nitrogênio e produção de sideróforos. Os dados foram analisados através do teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis e Wilcoxon utilizando o software R. Os resultados demonstraram que bactérias associadas a plantas de citros apresentam grande potencial e que a densidade populacional varia em relação ao nicho e ao hospederio. Dos 183 isolados obtidos, 80% dos isolados foram positivos para a produção de AIA, produzindo até  $85\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 55,7% produziram um ou mais tipos de enzimas, 48% solubilizaram fosfato, 37% foram positivos para fixação de nitrogênio e 60% para a produção de sideróforos. Confirmando o potencial para serem potenciais inoculantes da cultura.

**Palavras-chave:** Auxina, Amilase, rizosfera, porta -enxerto, solubilização.

## ABSTRACT

### **Study of growth potential promoter's bacteria in Citrus sp.**

Plant growth promoting bacteria shows beneficial mechanisms that can promote better development of the host plant. The interaction between host and bacteria can be affected by several factors, such as plant genotype, plant specie, and the niche with microorganims lived. The citros culture have a great socioeconomic importance for the country, which is one of the largest producers and exporters of citrus fruits. The aim of this study were to evaluate the bacterial communities associated with diferente hybrid citrus genotype, and observed the bacterial density, associated with niches diferentes and evaluate the potencial ability to become culture inoculantes. through the study of production growth promoters production substances. Bacterial strains were isolated from the rhizosphere niches, roots, stems and leaves of 13 different genotypes rootstock hybrids of citrus and evaluated its production capacity of amylase, cellulase, pectinase (polygalacturonase and pectate lyase), inorganic phosphate solubilization, IAA producing dependent pathway of tryptophan, the potential biological nitrogen fixation and production of siderophores. Data were analyzed using statistical nonparametric test of Kruskal-Wallis and Wilcoxon using the R software. The results showed that bacteria associated with citrus plants have great potential, and the population density varies from the niche and host plant. Of the 183 isolates from 80% of the isolates were positive for the production of IAA, producing up 85µg.mL<sup>-1</sup>, 55.7% produced one or more types of enzymes, solubilized 48% phosphate, 37% were positive for nitrogen fixation and 60% for the production of siderophores. Confirming the potential to be potential inoculants culture.

**Key Words:** auxin, amylase, rhizosphere, rootsotck,



## 1. INTRODUÇÃO

A cultura dos citros tem grande importância socioeconômica para o país. O Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja e por isso, sempre são necessárias medidas que busquem mitigar os riscos associados a cultura, e incrementar a produtividade, respondendo ao constante aumento da demanda do mercado.

A busca constante por medidas que levem ao aumento da produtividade da cultura, sem, no entanto, elevar os prejuízos ao meio ambiente aumentou a busca por alternativas sustentáveis diante das que existe atualmente. Dentre as novas alternativas, uma delas é a utilização de promotoras de crescimento de plantas.

Bactérias promotoras do crescimento de plantas são aquelas que podem habitar nichos específicos do hospedeiro, como a rizosfera ou o interior dos tecidos, sem causar dano ao mesmo. Suas interações podem ser benéficas ou neutras. Geralmente colonizam estes nichos por serem propícios ao seu desenvolvimento, com disponibilidade de nutrientes, como minerais, aminoácidos e açúcares.

Podem promover o crescimento das plantas através da produção de hormônios como o AIA, disponibilização de nutrientes como o nitrogênio, o fósforo e o ferro, além de produção de enzimas extracelulares, como amilases, celulasas e pectinases, onde esta última pode estar associada a indução e resistência sistêmica e auxiliar como agente de biocontrole de fitopatógenos. No entanto, as bactérias promotoras do crescimento de plantas podem ser afetadas por vários fatores, como o clima, estação do ano, nicho de isolamento, espécie e genótipo do hospedeiro, tipo de solo, umidade do solo, entre outros fatores.

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram estudar comunidade bacteriana associada a genótipos híbridos de citros selecionados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e fruticultura e através deste estudo observar a densidade bacteriana associada a diferentes nichos do hospedeiro, encontrar isolados que tenham capacidade de produzir substâncias de importância biotecnológica e mecanismos que auxiliem na promoção de crescimento de plantas e que com isso tenha potencial para tornarem-se futuros inoculantes para a cultura dos citros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cultura dos Citros

A família Rutaceae abrange diversos gêneros, sendo o gênero *Citrus*, o mais importante, compreendendo diversas espécies de grande importância socioeconômica, como as laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e azedas (*C. aurantium* L.), as limeiras doces (*C. limettioides* Tanaka; *C. limetta* Risso) e ácidas [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle], o limoeiro verdadeiro [*C. limon* (L.) Burm. f.], as tangerineiras [entre elas a 'Ponkan' *C. reticulata* Blanco), a 'Dancy' (*C. tangerina* hort. ex Tanaka) e a 'Mexeriqueira' (*C. deliciosa* Ten.)], o pomeleiro (*C. paradisi* Macfad.), a cidreira (*C. medica* L.) e a toranjeira [*C. maxima* (Burm.) Merr.] (Gomes, 1972; Gomes, 2007; Cunha Sobrinho et al., 2013).

Cunha Sobrinho et al. (2013) afirmam que as espécies de *Citrus* originaram-se na Ásia e arquipélago Malaio, e daí se dispersaram para outras partes do mundo. Pela sua grande capacidade de adaptação, é possível encontrar as espécies cítricas em centenas de países.

Atualmente, o Brasil figura como um dos maiores produtores mundiais de citros (FAO, 2015), com uma produção aproximada de 15 milhões de toneladas na safra de 2014 e um rendimento médio em torno de 23 t/ha colhidas em uma área de cerca de 650 mil hectares (IBGE, 2015).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA (2015), o Brasil também é líder na produção de suco de laranja, frente aos Estados Unidos, União Europeia e China, exportando aproximadamente 1 milhão e 200 mil toneladas do produto na safra de 2013/2014, o que equivale a cerca de 98% da produção nacional de suco. Com relação à produção do fruto *in natura*, o Brasil ocupa a 12ª posição mundial, exportando em torno de 20 mil toneladas. No entanto, a produção de tangerinas, limas e limões é inexpressiva, quando comparada aos principais produtores mundiais, que são a China e Espanha.

Os pomares de cítricos vêm, ano após ano, enfrentado fatores que influenciam sua produtividade, afetando diretamente a produção nacional e a economia que a cultura gera. Fatores abióticos, como maiores períodos de estiagem, e bióticos, como o surgimento de novas pragas e doenças, assim como o estabelecimento de pragas e doenças já conhecidas em campos nunca

antes infectados, a exemplo do Huanglongbing (HLB), bacteriose já conhecida a mais de 100 anos nos países asiáticos e que começou a atacar os pomares brasileiros em 2004, têm causado grandes impactos na produção dos citros a nível nacional e mundial (Teixeira et al., 2005)

Visando reduzir a influência destes fatores, os trabalhos de melhoramento genético vêm buscando plantas com características fenotípicas e genéticas que se destaquem. Aliado a isso, a cada dia são descobertos diferentes micro-organismos em associação benéfica com as culturas, abrindo portas para estudo do seu potencial e uso destes como promotores de crescimento de plantas.

## 2.2 Interação planta-micro-organismo

A interação ente endófito-hospedeiro e a relação entre comunidade bacteriana do solo e as plantas são objetos de amplo estudo, com diversas revisões sobre o tema (Hallmann et al., 1997; Ryan et al., 2008; Hayat et al., 2010; Glick, 2012; Glick, 2015; Santoyo et al., 2016). Esta interação pode ser maléfica, quando micro-organismos patogênicos ocupam os nichos e iniciam o parasitismo nos hospedeiros ou benéfica, ocorrendo a simbiose ou mutualismo, onde os micro-organismos produzem substâncias benéficas ou neutras que a planta utiliza e gera exsudados, açúcares, pronta disponibilização de nutrientes e até proteção.

A busca e o *screening* de uma população ou comunidade microbiana benéfica associada a planta, pode ser considerado um trabalho complexo, mas válido para a avaliação e seleção de bactérias benéficas. Durante esta busca, alguns micro-organismos podem ser considerados mais promissores que outros (Surette et al., 2003) e apresentar potencial para serem utilizados como promotores de crescimento de plantas. A interação benéfica entre as plantas e bactérias endofíticas e da rizosfera será abordada nos tópicos a seguir.

## 2.3 Bactérias rizosféricas associadas as plantas

A rizosfera é considerada a zona do solo que sofre influência direta das raízes, de acordo com Hiltner (1904) citado por Compant (2010), que foi o primeiro a definir o termo. A rizosfera é considerada a zona de solo que está aderido e ao redor das raízes, entretanto, o que realmente se pode dizer da rizosfera é

que a mesma é um nicho altamente atrativo para as bactérias, pois é uma zona de grande deposição de exsudados radiculares ricos em açúcares, aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes. A rizosfera também é responsável por originar grande parte dos micro-organismos endofíticos que habitam os tecidos vegetais (Germida et al., 1998; Berg, 2005; Doornbos, 2012)

Segundo Danhorn e Fuqua (2007), o solo rizosférico apresenta uma comunidade bacteriana mais abundante que o restante do solo. Isto se dá justamente pela presença de exsudados radiculares que atraem os micro-organismos. Além dos exsudados, há também os atrativos químicos, que são sinais que as raízes emitem para atrair as bactérias por quimiotaxia, como por exemplo, o ácido málico (Yaryura et al., 2008; Rudrappa et al., 2008).

A sinalização produzida pelas plantas hospedeiras para atrair as bactérias, depende do tipo de substância que é produzido em determinadas etapas do seu desenvolvimento. Algumas substâncias como a N-acetil homoserina lactona (AHLs), atuam como sinalizadores, estimulando o *quorum sensing*, e além dos próprios exsudados liberados pelo sistema radicular do sistema radicular (Bais et al. 2006; Doornbos et al., 2012).

Os exsudados radiculares são ricos em carboidratos e aminoácidos, como por exemplo, Yaryura et al.(2008) estudaram a colonização de raízes e sementes de soja pela bactéria rizosférica *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. Os autores detectaram a presença dos carboidratos frutose, arabinose, glucose, manose, galactose e dos aminoácidos asparagina, ácido  $\alpha$ -aminobutirico, glutamina, histidina, e que a concentração dos mesmos aumenta ao longo do tempo de crescimento.

Nos exsudados radiculares também existem substancias chamadas mucilagens, que auxiliam as raízes na abertura do caminho dentro do solo, além decompostos fenólicos, ácidos orgânicos, fitormônios, álcoois, vitaminas fitosideróforos, células mortas que se desprenderam da coifa, e outros metabolitos secundários que ainda precisam ser estudados para elucidar sua real função e que influências exercem na comunidade bacteriana (McNear Jr., 2013; Bacilio- Jiménez et al., 2003).

Além da influência do sistema radicular, a diversidade bacteriana é influenciada por fatores bióticos e abióticos que a afetam como um todo. Fierer e Jackson (2006) estudando a diversidade da comunidade bacteriana de mais de 100 amostras de solos, observaram que a comunidade bacteriana é afetada

pelas diferentes variáveis que afetam o solo, especialmente pelo pH, onde solos com pH próximo a neutralidade apresentam uma alta diversidade bacteriana, enquanto que solos mais ácidos apresentam uma diversidade menor. Esta afirmação é confirmada por Danhorn e Fuqua (2007), que ainda afirmam que outros fatores ambientais, além do pH, como conteúdo de água, nutrientes e minerais no solo, espécie e genótipo da planta, estado fisiológico em que a mesma se encontra e a interação com outros micro-organismos podem afetar a diversidade de espécies microbianas existentes na rizosfera.

Além disso, Doornbos et al. (2011) afirmam que a diversidade microbiana do solo abrange cerca de  $10^7$  espécies, e que só é possível acessar, no máximo, 10% das espécies, utilizando técnicas cultiváveis para o estudo deste microcosmo.

Aguirre-Garrido et al. (2012) estudaram a diversidade da comunidade bacteriana rizosférica associada a três espécies diferentes de cactos nativos do México, através de métodos cultiváveis e não cultiváveis. Dos 40 isolados selecionados, os autores observaram a existência de três filos principais: Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, dentre estes, a predominância do primeiro, principalmente da classe  $\alpha$ -Proteobacteria. Os isolados pertenciam a 13 gêneros bacterianos diferentes, sendo os dominantes: *Ochrobactrum* ( $\alpha$ -Proteobacteria), *Arthrobacter* (Actinobacteria) e *Bacillus* (Firmicutes), cujo o primeiro representa aproximadamente 25 % dos isolados estudados.

Ibekwe et al. (2010) também encontraram o Filo Proteobacteria e também Filos Acidobacteria e Bacterioide. No filo Proteobacteria, encontraram predominância da classe  $\gamma$ -Proteobacteria, enquanto estudavam a diversidade dos isolados obtidos no solo rizosférico da cultura do pepino.

#### 2.4 Bactérias endofíticas associadas as plantas

Como o filoplano e o solo rizosférico tem maior concentração bacteriana e são consideradas as principais fontes de origem das bactérias endofíticas, principalmente o solo rizosférico. As bactérias adentram o hospedeiro e tornam-se endofíticas através das aberturas dos estômatos, pelas rachaduras na epiderme existentes nos pontos de emissão de novas raízes laterais, pelos ferimentos causados por fungos ou nematoides, ou ferimento causado por

intervenção mecânica, picadas de prova por insetos vetores e pelas partes de raízes quebradas (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2006; Hardoim et al., 2008).

Bactérias endofíticas são definidas como aquelas que habitam o interior de órgão e tecidos de plantas saudáveis, sem causar sintomas de doenças, não expressando sinais externos ou estruturas visíveis e que não causem danos aos hospedeiros (Lacava et al., 2006; Schulz e Boyle, 2006; Ryan et al., 2008), e que possam ser isoladas de tecidos vegetais superficialmente desinfestados (Hallmann, 1997). Segundo Reis e Olivares (2006), bactérias endofíticas tem ciclo de vida similar ao de bactérias fitopatogênicas, diferindo das mesmas por causarem efeitos benéficos aos hospedeiros. Dentro deste contexto, fungos e bactérias são os micro-organismos mais encontrados nestes nichos.

Além disso, bactérias endofíticas podem habitar o interior de diversos órgãos vegetais, como flores, óvulos, pólen, caules, folhas, raízes, frutos e sementes (Hallmann e Kloepper, 1997; Mendes et al., 2007; Compant et al., 2008; Assumpção et al., 2009). Ainda podem ser transmitidos de geração para geração, principalmente via sementes, e também podem ser passados através do material de propagação vegetativa, de insetos vetores (Hallmann et al., 1997; Carroll 2014; Truyens et al., 2015).

Schulz e Boyle (2006), explicam que estar endofiticamente nos tecidos vegetais seria um estado momentâneo, pois estes micro-organismos em algum período ou estágio do seu ciclo de vida estiveram em outros habitats. Assim como Bruto et al. (2014) e Azevedo et al. (2000) afirmam que bactérias endofíticas poderiam ter vivido saprofiticamente no ambiente, em seguida, passaram a habitar a rizosfera, depois o rizoplane e em seguida os tecidos internos vegetais.

Além disso, a densidade populacional dos endófitos dentro do hospedeiro pode ser afetada por diversos fatores bióticos e abióticos (Hallmann et al., 1997) tais como a idade ou ciclo de vida do hospedeiro (Mattos et al., 2008), genótipo do hospedeiro, estação do ano (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), clima, espécie, tipo de solo, uso de defensivos agrícolas (Kuklinsky-Sobral et al., 2005) ou contaminação do ambiente.

Hardoim et al. (2008) apresentam uma teoria que afirma que bactérias endofíticas teriam dois tipos de ciclo de vida, dividindo-se em endófitos obrigatórios ou facultativos. Os endófitos obrigatórios (ou verdadeiros) tem a capacidade de colonizar a planta sistemicamente, movimentando-se pelos

tecidos vasculares do hospedeiro, e também de alterar o metabolismo do mesmo, sem interferir no equilíbrio do sistema planta. Ainda de acordo com esses autores, os endófitos facultativos (ou oportunistas), limitam-se a tecidos específicos ou a alguns órgãos específicos do hospedeiro. Schulz e Boyle (2006), que alegam que bactérias endofíticas facultativas podem ter ciclo de vida que alternam entre o ambiente e o hospedeiro.

Mattos e colaboradores (2008), avaliaram a densidade populacional e a distribuição do endófito diazotrófico *Burkholderia kururiensis* utilizando plantas axênicas de arroz in vitro, onde a bactéria foi inoculada na região rizosférica das plântulas, e inicialmente avaliadas aos sete dias após inoculação. Os autores encontraram uma densidade populacional de  $8 \times 10^9$  UFC. g TVF<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônia - UFC; tecido vegetal fresco - TVF) para as raízes e  $2,95 \times 10^6$  nas folhas, ou seja, a colonização predomina no sistema radicular, principalmente na região basal dos pelos radiculares, onde a partir destes, adentram a planta internamente e colonizam a região endodérmica e chegam ao xilema, onde a partir daí colonizam a parte aérea da planta.

Diferentes gêneros bacterianos podem ser encontrados habitando o interior das plantas hospedeiras, no entanto existem aqueles que se apresentam com mais frequência, considerados grupos dominantes. Dentre os gênero bacterianos dominantes encontramos os gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Enterobacter* (Santoyo et al., 2016).

Bactérias endofíticas já foram encontradas em uma infinidade de espécies vegetais, que variam entre espécies arbóreas, como Eucalipto (Procópio et al., 2009), pinheiros (Odee et al., 2002; Ulrich, 2008), plantas herbáceas (Gorlach-Lira e Coutinho, 2007), leguminosas. (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), frutíferas (Lacava et al., 2006; Dias et al., 2008; Le Nguyen et al., 2008; Torres et al., 2008), gramíneas (Velázquez et al., 2008; Gagne-Bourgue et al., 2013) e outras plantas como ornamentais e de uso têxtil (Hallmann e Kloepper, 1997; Giongo et al., 2013).

Com relação aos citros, Lacava et al. (2006), estudando a comunidade bacteriana associada a *Citrus sinensis* (cv. Natal), encontraram os gêneros *Curtobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Bacillus* spp., *Methylobacterium mesophilicum* e *X. fastidiosa*. Já Araújo et al. (2002), estudaram a comunidade da *C. sinensis* (cv. Natal) e de *Citrus reticulata* (cv. Blanco), e encontraram as bactérias *Bacillus pumilus*, *Curtobacterium*

*flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp., *Nocardia* sp., *Pantoea agglomerans*, e *Xanthomonas campestris*.

## 2.5 Propriedades benéficas da interação planta/bactéria

Bactérias endofíticas ou rizosféricas podem ser consideradas como promotoras de crescimento vegetal (BPCP- bactérias promotoras do crescimento de plantas) quando produzem substâncias ou disponibilizam nutrientes que geram incrementos no desenvolvimento o vegetal. Existem diferentes mecanismos que podem estimular o crescimento de plantas, que são similares para bactérias endofíticas e rizosféricas, e estes mecanismos podem ser diretos ou indiretos (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2006; Hayat et al., 2010; Saharan e Nehra, 2011).

Os mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal são aqueles que afetam diretamente o desenvolvimento vegetal. O principal destes mecanismos é a produção de hormônios que são semelhantes aos fitormônios, e são responsáveis por regular o crescimento e desenvolvimento vegetal (Hayat et al., 2010). Já Santoyo et al. (2016) afirmam que os mecanismos diretos podem ser a facilitação da aquisição de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fosforo e ferro, e a modulação de níveis hormonais dentro da planta, incluindo ou não a produção dos mesmos.

Os principais hormônios produzidos pelas bactérias são o ácido indol acético (AIA), giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno e jasmonatos sendo o primeiro amplamente estudado e em adição, ainda regula os níveis de outros hormônios, como o etileno, através da produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ou ACC deaminase). Enquanto que os principais mecanismos de facilitação de aquisição de nutrientes são através da fixação biológica de nitrogênio, solubilização e disponibilização de fosfatos, produção de sideróforos e aumentando a capacidade de absorção pelas raízes, por estimular crescimento das mesmas (Patten e Glick, 1996; Boiero et al., 2007; Santoyo et al., 2015; Santoyo et al. 2016).

Já as formas indiretas de promoção de crescimento vegetal ocorrem quando a bactéria previne ou limita o dano que poderia ser causado por algum fitopatógeno - como fungos, bactérias ou nematoides. Os mecanismos que as bactérias utilizam para promover o crescimento de plantas podem ser através de



substâncias antibióticas, como produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, que agem como agentes de controle biológico; produção de sideróforos, que atuam captando  $Fe^{3+}$  e limitando a quantidade de ferro disponível para o fitopatógeno; competição por espaço, através da ocupação dos mesmos nichos que os patógenos; induzindo resistência sistêmica na planta, através da produção de substâncias como o ácido cianídrico, compostos voláteis como o 2,3-butanodiol e a acetoina, e também pela produção de substâncias degradadoras da parede celular (Mariano et al., 2004; Lugtenberg e Kamilova, 2009; Glick, 2015; Santoyo et al., 2016).

## 2.6 Produção de Ácido Indol Acético por BPCP

O grupo das auxinas representa hormônios de extrema importância para o desenvolvimento vegetal, e estão envolvidos em diferentes fases de crescimento e atuam em diferentes partes da planta. Tem como principais efeitos o alongamento e divisão celular; diferenciação de tecidos vasculares; iniciação das raízes; dominância apical; respostas a tropismos; senescência foliar; atua em frutos e no florescimento (Davies, 2010; Costacurta e Vanderleyden, 1995).

Dentre as formas sintéticas e naturais de auxinas existentes, o ácido indol acético (AIA) é uma das mais comuns encontradas nas plantas e uma das mais estudadas (Patten e Glick, 1996; Spaepen et al., 2007; Davies, 2010). Patten e Glick (1996), afirmam que alguns micro-organismos têm capacidade de produzir o AIA semelhante ao encontrado nas plantas. Entretanto, estes micro-organismos podem ser benéficos ou ter efeitos deletérios nas plantas, como é caso da bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens*, que induz a formação de galhas no hospedeiro.

Para a biossíntese do AIA, existem duas rotas metabólicas possíveis no organismo bacteriano, semelhante aos vegetais. Uma das rotas depende da existência do aminoácido L-triptofano e a outra é independente do mesmo. O L-triptofano é considerado um dos precursores da biossíntese do AIA, e mesmo que algumas bactérias consigam produzir via independente deste aminoácido, a adição no mesmo ao meio de cultura de crescimento bacteriano incrementa a produção do hormônio (Spaepen et al., 2007)

A rota metabólica dependente do L-triptofano, segundo Spaepen et al. (2007) tem cinco vias diferentes, que são: 1) via Indol-3-acetamida; 2) via Indol-

3-pirutavo; 3) via triptamina; 4) via oxidase da cadeia lateral do triptofano e 5) via Indol-3-acetonitrila. As vias Indol-3-acetamida e Indol-3-pirutavo são as principais encontradas em bactérias, sendo a primeira melhor caracterizada (Lambrecht et al., 2000; Spaepen et al., 2007).

As vias para a rota metabólica independente de triptofano ainda não foram totalmente elucidadas, no entanto sabe-se que ocorrem tanto em bactérias quanto em plantas (Spaepen e Vanderleyden, 2011).

Diversos gêneros bacterianos já foram avaliados quanto a sua produção de AIA, como *Rhizobium* (Coatti et al., 2010); *Pseudomonas* sp. associados a planta de trigo (Egamberdieva, 2009); os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* também associados a plantas de trigo (Ali et al., 2009); *Micrococcus luteus*, *Streptoverticillium* sp., *Pseudomonas putida*, e *Gluconobacter* sp. associados a folhas de alface (Barazani e Friedman, 1999); *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Acinetobacter* associadas a plantas de soja (Kuklinsky-Sobral et al., 2004) entre outras. Além disso, Spaepen et al. (2007) afirmam que aproximadamente 80% das bactérias rizosféricas tem capacidade de produzir AIA.

### 2.7 Solubilização de Fosfato Inorgânico por BPCP

O fósforo (P) está entre os principais nutrientes requeridos para nutrição e desenvolvimento das plantas, sendo o segundo nutriente mais requerido pelas mesmas. Nestas, constitui parte dos fosfolipídios, ácidos nucleicos e ATP, além de regular o funcionamento de enzimas e o metabolismo da planta com um todo (Schachtman et al., 1998; Nautiyal, 1999). Nas células bacterianas, o P tem funções semelhantes as realizadas nas células vegetais.

Os solos das zonas tropicais normalmente são pobres em fósforo, e mesmo quando encontra-se em altas concentrações, nem sempre está em uma forma disponível para a pronta utilização pelas plantas. Isso ocorre por ser um elemento de sua baixa mobilidade e com afinidade para a formação de compostos insolúveis. E a deficiência de P limita o desenvolvimento e produtividade das culturas (Nautiyal, 1999; Glick, 2012). Taurian et al. (2009) afirmam que, mesmo quando o solo apresenta altos teores de P, apenas uma pequena fração está disponível, e mesmo com a aplicação de fertilizantes

fosfatados, as formas solúveis de P podem precipitar, tornando-se insolúveis, o que aumenta a necessidade do nutriente pela cultura.

As fontes de P no solo podem ser de origem orgânica ou inorgânica, mas as plantas o absorvem na forma de ânions da solução do solo ( $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$ ). Além disso, os micro-organismos podem aumentar a disponibilidade de P inorgânico pela liberação de prótons e ânions como  $\text{OH}^-$  e  $\text{CO}_2$  e ácidos orgânicos, como citratos, malatos entre outros. Enquanto que, para aumentar a disponibilidade do P orgânico, utilizam diferentes enzimas fosfatases (Richardson et al., 2009; Marschner et al., 2011; Glick, 2012). Já Taurian et al. (2009) afirmam que as bactérias podem disponibilizar ânions fosfato prontamente disponíveis através da solubilização do fosfato inorgânico pela secreção de ácidos orgânicos e fosfatases, ou seja, seria o mesmo processo tanto para P orgânico quanto para P inorgânico.

Dentre os efeitos benéficos diretos que as bactérias promotoras de crescimento apresentam, um deles é a capacidade de captar e disponibilizar nutrientes para as plantas, entre estes está a disponibilização de P. Diversos trabalhos tem estudado a comunidade bacteriana e a capacidade de solubilizar fosfatos, como Taurian et al. (2010), onde os autores avaliaram o potencial de solubilização in vitro de P inorgânico (fosfato de cálcio) por bactérias isoladas da rizosfera, filosfera e endofíticas de plantas de *Arachis hypogaea* L. Dos 433 isolados analisados pelos autores, aproximadamente 25% mostrou capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, e a maioria apresentou um índice de solubilização maior que 2,0 mm.

O índice de solubilização é utilizado para quantificar e avaliar a capacidade de solubilização de cada isolado. O mesmo é dado pela medida do halo de solubilização (em milímetros – mm) dividido pelo diâmetro da colônia (em mm), e o índice também é dado em mm, segundo Edi Premono et al. (1997) citado por Kumar e Narula (1999). Quanto maior o índice, maior a eficiência da bactéria em relação a solubilização de fosfatos.

Andrade et al. (2014), analisaram 40 isolados de raízes da banana, e observaram que 37% dos mesmos apresentaram capacidade de solubilizar P inorgânico, no entanto apenas 3 isolados apresentaram grande capacidade de solubilização, com índices acida de 2,0 mm.

A capacidade de solubilizar P inorgânico em vitro foi observada em isolados associados a diversas culturas e espécies vegetais como orquídeas

(Faria et al., 2013); soja (Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Assumpção et al., 2009); capim “switchgrass” (Gagne-Bourgue et al., 2013); feijão guandu (Souchie et al., 2007); colza (Etesami e Alikhani, 2016) entre outras.

## 2.8 Produção de sideróforos por BPCP

Sideróforos são agentes quelantes específicos, de baixo peso molecular, que são produzidos pelas bactérias em função da baixa disponibilidade de ferro. Apesar de serem moléculas pequenas, os mesmos tem alta afinidade com o ferro, principalmente o íon  $Fe^{3+}$  (Neilands, 1995; Hayat et al., 2010; Saharan e Nehra, 2011). Os sideróforos foram objeto de ampla revisão realizada por Neilands (1995) e Barry e Challis (2009).

Existem diversos tipos de sideróforos produzidos por micro-organismos, e parte destes foram compilados no trabalho apresentado por Benite et al. (2002). Os tipos de sideróforos mais comuns produzidos por micro-organismos são do tipo catecolato, o hidroxamato e o carboxilato (Ahmed e Holmström, 2014). Uma mesma bactéria pode produzir um ou mais tipos de sideróforos, como é o caso da *Pseudomonas sp.*, que é um dos gêneros bacterianos mais estudados, e produz cerca de 60 tipos de sideróforo do tipo pioverdina, pertencente ao grupo dos catecolato (Schalk e Braud, 2011; Schalk e Guillon, 2013; Ahmed e Holmström, 2014)

A dinâmica da produção de sideróforos já foi estudada com a comunidade bacteriana associada a diferentes culturas e também já foi estudada em diferentes micro-organismos. Loaces et al. (2011) estudaram a produção de sideróforos da comunidade bacteriana associada a plantas de arroz. Os autores perceberam que a frequência de isolados positivos para a produção de sideróforos era diferente em relação a maturidade da planta, e encontraram os seguintes gêneros bacterianos *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pantoea*.

Szilagyi-Zecchin et al. (2014) estudaram 7 bactérias associadas a raízes de milho, e cerca de 90 % dos isolados estudados apresentaram capacidade de produzir sideróforos *in vitro*. As bactérias foram associadas com os gêneros *Bacillus sp.* e *Enterobacter sp.*, onde só as do gênero *Enterobacter sp.* não produziram sideróforos.

A produção de sideróforos por bactérias pode indicar que as esmas tem potencial para serem utilizadas como agentes de biocontrole, ou pode indicar algum fator de virulência em bactérias patogênicas. Geralmente, bactérias que produzem sideróforos tem capacidade de concorrer com fitopatógenos por adquirirem o ferro disponível no ambiente, criando uma zona de depleção no local e assim inibindo ou prejudicando o desenvolvimento dos (Benite et al., 2002; Khan, 2005).

### 2.9 Fixação biológica de nitrogênio por BPCP

Assim como o fósforo, o nitrogênio (N) se encontra entre os nutrientes mais requeridos pelas plantas, sendo o primeiro nutriente mais exigido, pois tem função direta sobre o desenvolvimento vegetal. É demandado em grandes quantidades e participa da síntese de DNA, RNA, enzimas, proteínas e clorofila, e sua ausência reduz o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas (Hayat et al., 2010).

A atmosfera é constituída por aproximadamente 78% de nitrogênio em seu estado gasoso ( $N_2$ ). O  $N_2$  em sua forma gasosa apresenta uma tripla ligação que nem as plantas nem os animais conseguem quebrar. No entanto, existem algumas bactérias que conseguem quebrar esta ligação, e transformar o nitrogênio em formas assimiláveis pelas plantas. As formas mais comuns de N que as plantas conseguem absorver são o  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$  (nitrato e amônio, respectivamente).

O nitrogênio pode entrar no sistema solo-planta por quatro formas principais: deposição atmosférica, emprego dos restos culturas, adubação nitrogenada e fixação biológica de nitrogênio (Novais et al.) Uma vez no solo, o N torna-se um elemento bastante móvel, e tende a ser facilmente lixiviado, principalmente quando se encontra na forma nitrato, acarretando na perda de produtividade das culturas e a prejuízos financeiros aos produtores, pois boa parte da adubação pode ser perdida, se não houver o manejo adequado.

A quebra da dupla ligação do  $N_2$  e disponibilização do N para as plantas através das bactérias é chamada fixação biológica de nitrogênio (FBN) e é considerada um mecanismo direto de promoção de crescimento de plantas. Bactérias promotoras de crescimento que apresentam a capacidade de

converter o N<sub>2</sub> em amônia também podem ser chamadas de diazotróficas (Dobbelaere et al., 2003). (Augusto *et al.*, 2009)

As bactérias diazotróficas conseguem realizar a FBN através da produção da nitrogenase. A nitrogenase é um complexo enzimático catalisa a transformação do N<sub>2</sub> em NH<sup>4+</sup>, através das bactérias. De acordo com Reis et al. (2005) a nitrogenase é composta por duas unidades, uma chamada dinitrogenase redutase (Fe-proteína) e a outra é chamada dinitrogenase (MoFe-proteína). As duas funcionam de forma conjunta durante a fixação biológica de nitrogênio, onde a primeira transfere elétrons através da redução do N<sub>2</sub> e a segunda é onde a reação propriamente dita acontece. Ainda segundo Reis et al. (2005), existem três tipos de nitrogenase: a MoFe-nitrogenase (molibdênio e ferro), a VFe-nitrogenase (vanádio e ferro) e a Fe-nitrogenase (ferro), onde bactérias fixadores de nitrogênio podem um, dois ou os três tipos.

Além do mais a atuação da nitrogenase e conseqüentemente a FBN, é um processo regulado e influenciado por diferentes fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores abióticos, a disponibilidade de fontes de N é uma delas. Assim, quando uma fonte de N amoniacal é adicionada aos solos, a nitrogenase pode ser inativada, onde a mesma é responsável pela redução do N<sub>2</sub>, além da deficiência de Ferro, Molibdênio e Vanádio; a concentração de O<sub>2</sub> no solo, entre outros fatores (Rudnik et al., 1997; Reis et al., 2005; Moreira et al. 2010).

Segundo Döbereiner e Day (1970) citado por Sala et al. (2005) Para isolamento e identificação *in vitro* de bactérias capazes de fixar nitrogênio, é ideal a utilização de meio semissólido livre de N, pois esse meio limita a difusão de O<sub>2</sub>, facilitando o desenvolvimento das bactérias, que em maioria são microaerofílicas preferindo sítios na planta ou no solo que tem uma menor concentração de O<sub>2</sub>.

Szilagy-Zecchin et al. (2014), estudaram a capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro* por seis isolados de raízes de milho, utilizando meio NFb semissólido, encontraram 4 isolados positivos para a fixação biológica, que foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus sp.* e *Enterobacter sp.*

Jha et al. (2009), isolaram bactérias de raízes e caules de trigo e identificaram que as mesmas pertenciam ao gênero *Achromobacter sp.* como fixadora de N<sub>2</sub>. Já Ikeda et al. (2013), obtiveram 217 isolados bacterianos oriundas de 7 genótipos de milho, em 4 meios diferentes e livres de nitrogênio (NFb, JNFb, LGI e LGI-P), onde 35 destes isolados foram sequenciados,

encontrando-se os gêneros *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus*, e *Pantoea*.

Andrade et al. (2014), estudando 40 isolados bacterianos de raízes de banana, observaram que 83% dos isolados mostrou capacidade de formar películas em meio NFb, e os positivos foram identificados como *Bacillus subtilis* *Bacillus pumilus*.

Existem diversos tipos de meios de cultura utilizados para avaliar in vitro a FBN, que podem ser específicos para cada gênero de micro-organismo estudado. Uma parte destes meios é descrita no trabalho publicado no Documento 110, publicado pela Embrapa Agrobiologia - CNPAB, (Documentos 110) escrito por Döbereiner et al. (1999).

### 2.10 Produção de enzimas por BPCB

Dentre os produtos secundários produzidos pelas BPCP, estão a produção de enzimas. Estas enzimas, além da importância na relação bactéria-planta, também podem ter interesse econômico, biotecnológico e industrial (Azevedo, 1998; Carrim et al., 2006).

A produção de enzimas por BPCP podem auxiliar na penetração e colonização dos hospedeiros, e ter efeito auxiliar como agentes de controle biológico. Na colonização, auxiliam degradando a parede celular do hospedeiro, facilitando a penetração da bactéria e posterior estabelecimento. Dentre todas as enzimas produzidas pelas bactérias e estudadas, destacamos as celulasas, amilases e pectinases - Pectato Liase e Poligalacturonase (Hallmann et al., 1997; Compant et al., 2010).

Pectinases e celulasas tem capacidade de degradar substâncias pecticas que estão presentes na parede celular do hospedeiro, sendo considerada uma das principais peças para colonização (Verma et al., 2001).

As pectinases tem grande importância também na indústria alimentícia, principalmente no processamento de frutas e seus derivados. Existem tres grupos de pectinas: a esterase; as despolimerizantes e as protopectinases. A poligatacturonase e a pectato liase estão incluída no grupo das despolimerizantes. A poligalacturonase tem ação em pH mais ácido e a pectato liase em pH mais alcalino (Uenojo e Pastore, 2006; Uenojo e Pastore, 2007).

As amilases produzidas por bactérias têm grande potencial de aplicação industrial e tem como vantagens a possibilidade de serem produzidas em

grandes quantidades, serem mais econômicas e de fácil manipulação. A  $\alpha$ -amilase é o tipo de amilase mais produzido e utilizado, além disso, é o principal tipo produzido por bactérias (Souza e Magalhães, 2010).

Para a comunidade bacteriana, a produção de enzimas auxiliam no crescimento e sobrevivência da população, por aumentarem a disponibilização de nutrientes, evitarem a ação de algumas toxinas deletérias e o desenvolvimento de organismos patogênicos (Burns, 1982; Gorlach-Lira e Coutinho, 2007).

### 2.11 BPCP e o potencial de Controle Biológico

Micro-organismos patogênicos são uma grande ameaça a produção de alimentos e a estabilidade dos ecossistemas em todo o mundo. Com intuito de reduzir ou suprimir o uso de defensivos agrícolas para controlar pragas e doenças nas culturas, a prospecção de BPCP tem sido realizada. Bactérias endofíticas e rizosféricas têm mostrado grande potencial como agentes de biocontrole, e que, além de diminuir o uso de defensivos, tem maior nível de segurança ao aplicador e afeta de forma mínima o meio ambiente, causando poucos impactos ambientais (Azevedo et al., 2000; Compant et al., 2005; Arfaoui, et al. 2006).

A atividade antagonística a patógenos pode ser exercida através dos seguintes mecanismos: concorrência por nicho ecológico, produção de aleloquímicos, indução de resistência sistêmica, indisponibilização de ferro e outros nutrientes (Compant et al., 2005).

Na literatura, diversos trabalhos vêm utilizando BPCP como agentes de controle biológico, como Szilagyi-Zecchin et al. (2014) que encontraram dois isolados, identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. Mostrando antagonismo ao crescimento dos fungos *Fusarium verticillioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolaris maydis* e *Cercospora zea-maydis*, todos microrganismos patogênicos a cultura do milho.

Kupper et al. (2003) avaliaram a atividade antagonística de 60 *Bacillus* spp. isolados de folhas e flores de Citrus ao fungo *Colletotrichum acutatum*, que causa a queda prematura dos frutos de citros, utilizando a técnica de cultivo pareado em placas com meio BDA (Batata, dextrose e ágar). Os autores observaram que houve uma forte inibição do crescimento do patógeno, com



distância variando de 0,95 a 2,10 cm da borda da colônia, indicando a existência da produção de compostos voláteis que impediram o crescimento do mesmo e a modificação de sua morfologia, quando visualizado em microscópio.

Ting et al. (2008), buscaram encontrar isolados, de raízes bananeiras selvagens, que mostrassem capacidade de impedir ou diminuir o desenvolvimento de patógenos. Estes isolados foram inoculados em plântulas saudáveis e infectadas com *Fusarium* sp., e os autores perceberam que as plantas saudáveis tiveram um grande desenvolvimento, enquanto que as infectadas conseguiram manter crescimento normal, supondo-se que os isolados inoculados aumentaram a tolerância da planta ao patógeno.

Pelzer et al. (2011), estudaram o potencial de biocontrole de 4 isolados bacterianos, oriundos de diferentes nichos e espécies vegetais, ao fungo patogênico *Sclerotium rolfsii*. Os autores testaram o antagonismo *in vitro* e *in situ*, em plântulas de tomate inoculado com o patógeno, apenas um isolado se mostrou capaz de inibir o desenvolvimento do patógeno.

### 2.12 Diversidade genética de bactérias promotoras do crescimento de plantas

Segundo van Elsas e Boersma (2011), a capacidade de acessar a comunidade microbiana do solo via métodos cultiváveis restringe-se uma pequena parte das espécies existentes, chegando ao máximo 10 % (Doornbos et al., 2012). Os métodos cultiváveis são aqueles que dependem de isolamento em meios de cultura seletivos, semi-seletivos ou não seletivos para obter-se os isolados bacterianos de interesse.

Para identificar e agrupar isolados obtidos através de métodos cultiváveis, existem diferentes marcadores que são comumente utilizados nos estudos da diversidade bacteriana, como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), o REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*) e o BOX-PCR. Também para estudos de diversidade e identificação, o sequenciamento do parcial do gene 16S rRNA é um dos métodos mais utilizados (Andreote et al., 2008).

Existem outros métodos que permitem ampliar a capacidade de acessar esta comunidade, são chamados de métodos não cultiváveis. Dentre as ferramentas moleculares que podem acessar uma parte da comunidade microbiana não cultivável, encontram-se o como o DGGE (*Denaturing Gradient*

*Gel Electrophoresis*), o TGGE (Temperature Gradient Gel *Electrophoresis*), o qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) e a formação de bibliotecas de clones, no entanto o DGGE é uma das mais utilizadas (van Elsas et al., 1998; Andreote et al., 2008; van Elsas e Boersma, 2011).

O BOX-PCR baseia-se na técnica REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*), amplificando sequências de DNA repetitivas intercaladas presentes em genomas bacterianos. No entanto os dois diferem de algumas formas, uma delas é pelo iniciador utilizado, onde o segundo utiliza iniciadores complementares e o BOX apenas um único iniciador, que é o BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). O Iniciador BOX A1R amplifica sequências ou regiões do DNA repetitivas presentes no genoma da maioria das bactérias. Esta região consiste de três elementos, o elemento BOX-A, BOX-B e O BOX-C, onde o primeiro é o mais estudado. Além disso, o BOX-PCR possibilita uma diferenciação mais acurada, entre nível de espécie, subespécie e patovar (Marques et al., 2008; Lee e Wong, 2009).

O uso do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA tem sido realizado para estudar a filogenia da comunidade bacteriana, por ser encontrado na maioria das bactérias, é uma região bastante conservada e tem tamanho suficiente para ser manipulado via bioinformática (Janda e Abbott, 2007). O uso desta ferramenta possibilita a identificação dos isolados de forma rápida, confiável e com baixo custo (Toledo et al., 2009).

Ikeda et al. (2013) estudaram a diversidade bacteriana associada a raízes de 7 diferentes genótipos de milho, utilizou a técnica de BOX-PCR e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. O BOX-PCR revelou uma grande variabilidade genética entre os isolados estudados, e uma parte dos isolados foi identificada como pertencente aos gêneros *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Pantoea*.

Já Lacava et al. (2006) estudaram a comunidade bacteriana endofítica associada a caules de plantas de citros, encontraram os gêneros *Curtobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* e *Bacillus spp.* Enquanto que Lata et al. (2006), encontraram bactérias do gênero *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* dentre os isolados de plantas micropropagadas de *Echinacea*.

Apesar da importância econômica e social dos citros, a cultura ainda não foi contemplada com uma gama de trabalhos que esclareçam sua associação

com a comunidade bacteriana endofítica e do solo, havendo a necessidade de mais estudos. Alguns dos trabalhos que estudaram a comunidade bacteriana associada a citros foram realizados por Araújo et al. (2002), Lacava et al. (2004) e Lacava et al. (2006).

Diante do abordado, observa-se a importância da comunidade bacteriana associada ao solo, a plantas de citros e também do estudo destas. Os citros, por serem culturas perenes, economicamente importantes e por estarem sob constante ameaça de diferentes patógenos, possuem a necessidade de buscar novas biotecnologias, que sejam baratas e que não gerem grande impacto no meio ambiente. E assim incrementar a produtividade e a sanidade dos pomares, gerando mudas e frutos de qualidade. A utilização de inoculantes ou defensivos baseados em micro-organismos, tendem, conseqüentemente, a diminuir os custos de produção e induzir a uma agricultura mais sustentável.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de folhas, ramos, raízes e solo rizosférico, de genótipos híbridos de citros instalados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no município de Cruz das Almas-BA.

O clima local é considerado tropical quente e úmido, Aw a Am, de acordo com a classificação de Köppen, com temperaturas médias anuais de 24,5° C, umidade relativa de 80 % e precipitação média anual de 1.200 mm (Lessa *et al.*, 2009). As coletas foram realizadas no mês de julho de 2015, no período do inverno.

Foram selecionadas plantas saudáveis, sem sintomas de doenças aparente, nem ataque de pragas. A coleta das amostras foi realizada em julho de 2015. Para a coleta de folhas e ramos, foram selecionados aqueles que não apresentavam nenhum tipo de dano ou macha. Os ramos escolhidos eram considerados jovens, começando a tornarem-se lenhosos.

Para a coleta das raízes, foi aberta uma pequena cova, entre 20 e 30 cm de profundidade, próximo a planta previamente selecionada. Para coleta do solo, utilizou-se a mesma cova, coletando-se o solo que estava aderido nas raízes e o mais próximo possível do sistema radicular.

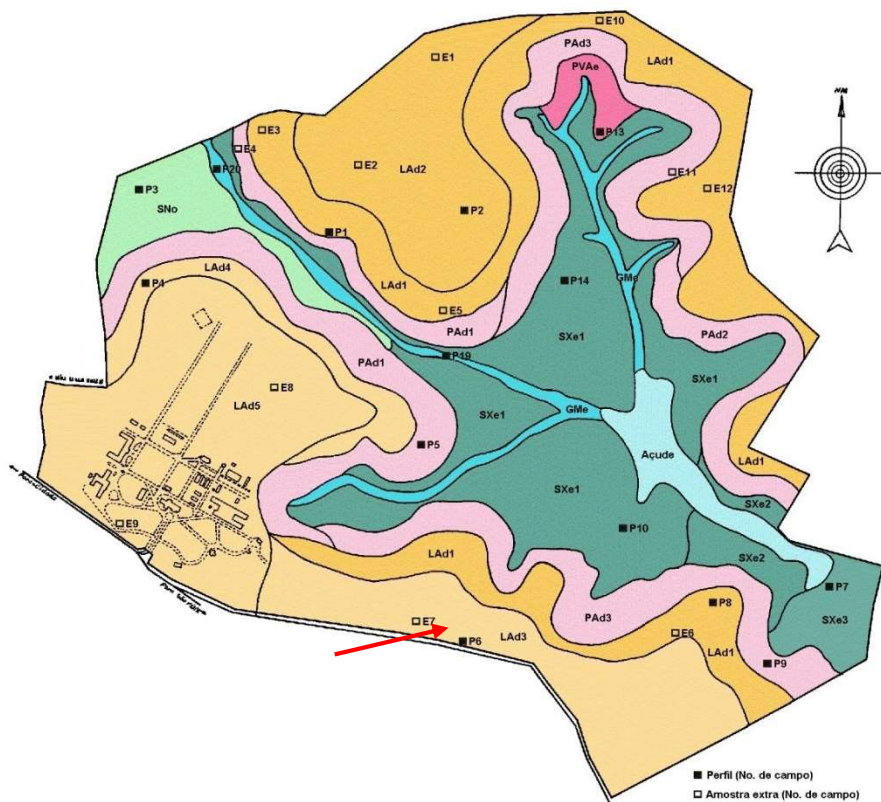
Entre cada coleta, o material utilizado (tesoura de poda, enxadeco e pá) foram limpos com álcool 70%. E todo material coletado foi mantido em baixa temperatura até o momento do processamento.

Para este trabalho, foram selecionados 13 genótipos híbridos de porta enxerto de *Citrus sp* com quatro diferentes combinações de porta-enxerto, coletadas em 4 diferentes locais do BAG. Os genótipos utilizados e suas combinações e locais de coleta estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Lista dos genótipos híbridos selecionados e localização no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

<b>Genótipo</b>	<b>Local</b>	<b>Porta-enxerto</b>	<b>Código</b>
LCR x TR – 001	QHS1	VOLKAMERIANO	001v
Citrandarin San Diego 314	BAG4	SWINGLE	C314s
Citrandarin Índio 256	BAG4	SWINGLE	C256s
Citrandarin Riverside 264	BAG4	SWINGLE	C264s
LRF x (LCR x TR) 005	QHS2	VOLKAMERIANO	05v
HTR – 051	QHS1	VOLKAMERIANO	51v
TSKC x CTSW – 028	QHS2	VOLKAMERIANO	28v
HTR – 069	QHS1	VOLKAMERIANO	69v
TSKCX x (TR x LCR) 059	QHS2	VOLKAMERIANO	59v
SK x BK – 00	QSH1	311	00p311
SunkiTropical	BAG 1	VOLKAMERIANO	SKTv
Sunki Maravilha	BAG 1	VOLKAMERIANO	SKMv
Limão Cravo Santa Cruz	BAG 1	VOLKAMERIANO	LCRv

O solo onde se encontra instalado o BAG de Citros do CNPMF é descrito como o LAd3, ou seja, Latossolo Amarelo distrocóeso típico, textura argilosa, A moderado, caulínítico, hipoférrico, muito profundo, ácido, fase transição floresta tropical subperenifólia/subcaducifólia, declive 0 a 3% (SOUZA e SOUZA, 2001). Na figura 1, podemos observar o mapa de solos da Unidade e o local onde o BAG está instalado.



**Figura 1.** Mapa de solos da CNPMF. Área do BAG de citros indicada com seta vermelha. Fonte: Souza e Souza, 2001.

As características química do solo onde está estabelecido o BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi descrita por Santana et al.(2006) e se encontra na Tabela 2 (com modificações).

**Tabela 2.** Características químicas de Latossolo Amarelo onde se localiza do BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Horizonte	pH H <sub>2</sub> O	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	CTC(1)	V	MO
m		----mg dm <sup>-3</sup> --		-----cmolc dm <sup>-3</sup> -----				%	g kg <sup>-1</sup>
Ap (0-0,09 m)	5,96	23,63	58,60	2,09	0,90	0,00	4,61	68,19	13,3
AB (0,09-0,38 m)	5,62	5,53	52,40	1,10	0,69	0,18	4,18	45,94	8,6
Bw <sub>1</sub> (0,38-0,72 m)	4,87	1,66	27,67	0,77	0,34	0,61	4,18	28,29	6,7
Bw <sub>2</sub> (0,72-1,20 m)	4,61	0,52	23,80	0,68	0,27	0,75	3,85	25,83	6,0

(1) CTC = capacidade de troca de cátions; V = saturação por bases; e MO = matéria orgânica. FONTE: Santana et al., 2006 com modificações

### 3.2 Isolamento de bactérias endofíticas e rizosféricas

#### **Endofíticas**

As amostras de folhas, caules e raízes foram coletadas, e levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Ao chegar no laboratório as folhas, ramos e raízes foram imediatamente lavadas e secas para a retirada de resquícios de poeira, solo e outras impurezas. Em seguida, o material vegetal fresco foi pesado e cerca de 1 grama foi utilizado no procedimento. Em seguida, foi realizada a desinfecção superficial do material, seguindo a metodologia descrita por Araújo et al. (2010). A desinfecção superficial consistiu em imergir o material em etanol 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) por 3 minutos e imergir novamente o material em etanol 70% por 30 segundos. Em seguida, a amostra foi enxaguada três vezes em água destilada estéril. Alíquotas da água do último enxague foram semeadas em placas de petri contendo meio TSA 10% (Tryptic Soy Agar: 1,5g L<sup>-1</sup> de triptona, 0,5g L<sup>-1</sup> de peptona, 1,5g L<sup>-1</sup> de NaCl, 15 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico; água destilada q.s.p.) para verificar a eficácia de desinfecção.

O material já desinfetado foi macerado (Araújo et al., 2010) com 3mL de tampão salino PBS (Phosphate Buffered Saline- PBS: 1,44g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,20g L<sup>-1</sup> de KCl; 8,00g L<sup>-1</sup> de NaCl; pH 7,4) estéril. Em seguida, todo conteúdo triturado foi transferido para tubos estéreis tipo Falcon, com capacidade de 50mL e incubados por três horas, sob agitação constante (125rpm). Após a incubação, foram realizadas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup>. As diluições foram semeadas em triplicada, em placas de Petri contendo meio de cultura não seletivo TSA 10% e incubadas em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), sob a temperatura de 28°C. As placas foram avaliadas por até 15 dias após a semeadura, observando-se o número de colônias crescidas.

A população bacteriana endofítica cultivável foi contabilizada em unidades formadoras de colônia por grama de tecido fresco (UFC.g.TVF<sup>-1</sup>), através da contagem do número de colônias por placa aos 4, 8 e 15 dias de incubação.

Foram selecionadas colônias morfologicamente diferenciadas em relação a cor, borda, textura da colônia, formato da colônia, elevação e superfície. As

colônias selecionadas foram inoculadas em novas placas de petri contendo TSA 10% e purificadas pela técnica de esgotamento.

### **Rizosféricas**

Após a coleta no campo, as amostras de solo rizosférico foram acondicionadas em isopor com gelo, e em seguida levadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos vegetais na Embrapa Mandioca e Fruticultura, e foram mantidas a baixa temperatura até o momento da realização dos procedimentos de isolamento.

Para o isolamento, foram pesados 5 gramas de solo rizosférico de oriundo de cada genótipo, e dispostos em erlenmeyers contendo 50 mL de tampão salino PBS estéril, acrescentado de 5g de pérolas de vidro esterilizadas. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação horizontal constante (125rpm) por 2 horas. Alíquotas de 100uL do sobrenadante foram retiradas e realizadas diluições seriadas em tampão salino PBS esterilizado, de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ . As diluições foram inoculadas, em placas de petri contendo meio não seletivo TSA 10%, em triplicada. Foram incubadas em B.O.D., sob a temperatura de 28°C. As placas foram avaliadas por até 15 dias após a semeadura, observando-se o crescimento das colônias.

A população bacteriana cultivável do solo rizosférico foi contabilizada em unidades formadoras de colônia por grama de solo fresco (UFC.g.SF<sup>-1</sup>), através da contagem do número de colônias por placa aos 4, 8 e 15 dias de incubação.

Assim como para as bactérias endofíticas, também foram selecionadas colônias morfologicamente diferenciadas em relação a cor, borda, textura da colônia, formato da colônia, elevação e superfície. As colônias selecionadas foram inoculadas em novas placas de Petri contendo TSA 10% e purificadas pela técnica de esgotamento.

### **3.3 Caracterização dos Isolados**

Cerca de 183 isolados purificados foram selecionados para a realização deste trabalho. Os mesmos foram caracterizados quanto produção de enzimas de importância biotecnológica, quanto a produção de substâncias promotoras de crescimento e quanto a diversidade genética.



### 3.4 Produção de enzimas de importância biotecnológica

#### **Celulase**

A identificação de isolados bacterianos produtores de enzimas celulolíticas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Teather e Wood (1982) com modificações. O meio de cultura TSA 10% sólido foi acrescentado de 1% de carboximetilcelulose - CMC (Sigma), para cada litro de meio, autoclavado e vertido em placas de petri. Os isolados avaliados foram inoculados em triplicatas nas placas de petri, e as mesmas foram incubadas em B.O.D. a temperatura de 28°C por 72 horas.

Após o período de incubação, foram adicionados 10 mL da solução do corante Vermelho Congo ( $1\text{g L}^{-1}$  de vermelho congo para 1L de água deionizada) as placas com o crescimento, permanecendo cobertas por 10 minutos. Em seguida, descartou-se o corante e cobriu-se as placas com solução de NaCl 5M por 10 minutos. Em seguida a solução foi descartada e as placas observadas.

A avaliação foi realizada de forma qualitativa, observando os isolados negativos e positivos, cujos positivos apresentaram um halo amarelo claro ao redor da colônia, em contraste com a cor vermelha do meio após a coloração com o corante vermelho congo. E também de forma quantitativa, através da medida do tamanho do halo de degradação. Para avaliar o índice enzimático, foi feita uma relação entre a média do diâmetro do halo de degradação dividido pelo diâmetro da colônia, ou seja,  $IE = \frac{\text{Ø halo de degradação}}{\text{Ø colônia}}$ .

#### **Amilase**

A identificação de isolados bacterianos produtores de enzimas amilolíticas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975) com modificações. O meio de cultura TSA 10% foi acrescentado de 1% de amido de milho solúvel (Maizena®) para cada litro de meio, em seguida autoclavado e vertido em placas de petri. Os isolados foram inoculados por picada, em triplicatas, nas placas e as mesmas foram incubadas em B.O.D. a temperatura de 28°C por 72 horas. Após a incubação, foi adicionada solução de lugol (1%), e mantida por 10 minutos. Em seguida a solução foi descartada e as placas observadas.

A avaliação foi realizada de forma qualitativa, observando os isolados negativos e positivos, onde os positivos apresentaram um halo claro ao redor da colônia, em contraste com a cor azul escura do meio após coloração com lugol. E também de forma quantitativa, através da medida do tamanho do halo de degradação. Para avaliar o índice enzimático, foi feita uma relação entre a média do diâmetro do halo de degradação dividido pelo diâmetro da colônia, ou seja,  $IE = \frac{\text{Ø halo de degradação}}{\text{Ø colônia}}$ .

### **Pectinases**

A identificação de isolados bacterianos produtores de enzimas pectinolíticas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975) com modificações. O meio de cultura TSA 10% foi acrescentado de 1% de Pectina Cítrica (Sigma) para cada litro de meio. Para a identificação de isolados produtores da enzima Pectato Liase, o pH do meio de cultura foi ajustado para 8,0 e para identificação de isolados produtores da enzima Poligalacturonase, foi ajustado para 5,0. Em seguida os meios foram autoclavados e vertidos em placas de petri. Os isolados foram inoculados em triplicatas nas placas e as mesmas foram incubadas em B.O.D. a temperatura de 28°C por 72 horas. Após a incubação, as placas foram cobertas com solução de lugol (1%) por 10 minutos. Em seguida a solução foi descartada e as placas observadas.

A avaliação foi realizada de forma qualitativa, observando os isolados negativos e positivos, onde os positivos apresentaram um halo claro ao redor da colônia, em contraste com a cor marrom do meio após a coloração com lugol. E também de forma quantitativa, através da medida do tamanho do halo de degradação. Para avaliar o índice enzimático, foi feita uma relação entre a média do diâmetro do halo de degradação dividido pelo diâmetro da colônia, ou seja,  $IE = \frac{\text{Ø halo de degradação}}{\text{Ø colônia}}$ .

### 3.5 Produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas

#### **Solubilização de fosfato inorgânico**

A identificação de isolados bacterianos com capacidade para solubilizar fosfato inorgânico foi realizada segundo a metodologia descrita por Verma et al. (2001) e Silva et al. (2012). Para a identificação, foi utilizado o meio fosfato modificado (Meio fosfato: 10,0 g L<sup>-1</sup> de Glicose; 5,0 g L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl; 1,0 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 4,0 g L<sup>-1</sup> de CaHPO<sub>4</sub>; 15,0 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e água deionizada q.s.p.), proposto por Silva (2012), com pH ajustado para 7,2. O meio foi autoclavado e vertido em placas de petri. Os isolados bacterianos foram inoculados em triplicata e incubados em BOD, sob temperatura de 28°C por 5 dias

A avaliação foi realizada de forma qualitativa, observando os isolados negativos e positivos, onde os positivos apresentaram um halo transparente ao redor da colônia. E também de forma quantitativa. Para avaliar o índice de solubilização foi feita uma relação entre a média do diâmetro do halo de solubilização dividido pelo diâmetro da colônia, ou seja,  $IS = \frac{\text{halo de solubilização}}{\text{Ø colônia}}$ .

#### **Produção de ácido indol acético (AIA)**

Para identificação de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA), foi usada a rota dependente do aminoácido triptofano, segundo metodologia descrita por Bric et al. (1991) e Araújo et al. (2009) com modificações.

Os isolados bacterianos foram inoculados em meio TSA 10% líquido acrescido de 5mM L<sup>-1</sup> de L-triptofano (Vetec), e incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm), durante 24 horas, na total ausência de luz. Cada isolado foi testado em triplicata.

Após o crescimento, dois mililitros da cultura foram centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos. Seguido da centrifugação, foi retirada uma alíquota de 900 uL do sobrenadante e adicionados 400uL do reagente de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5M em 35% de ácido perclórico), e incubados durante 30 minutos na ausência de luz para que ocorra a reação colorimétrica. A avaliação foi realizada de forma qualitativa, observando isolados positivos e negativos, onde os

positivos apresentaram a coloração rosa em diferentes tons. E quantitativa, através da quantificação da reação em espectrofotômetro (absorbância), com comprimento de onda a 530nm (Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis). A concentração de AIA em  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  foi estimada de acordo com curva padrão de calibração, utilizando AIA sintético (Sigma) em valores conhecidos 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em meio TSA 10% líquido estéril (Barbosa, 2010).

### Fixação biológica de nitrogênio

Para a identificação de bactérias possivelmente fixadoras de nitrogênio atmosférico, foram utilizados quatro meios de cultura livres de fonte nitrogenada, seguindo protocolo descrito por Döbereiner et al. (1999). Foram testados meios específicos para os gêneros bacterianos: **JMV** para *Burkholderia* spp., **NFB** para *Azospirillum* spp, **LGI-P** para *Gluconacetobacter diazotrophicus* e **JNBb** para *Herbaspirillum* spp. Os meios testados foram **JMV** (5 g L<sup>-1</sup> de manitol; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>; 0,1 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,2 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 2 mL solução de azul de bromotimol; 2 mL de solução de micronutrientes - ; 1 mL da solução de vitaminas; 4mL de FeEDTA; 2,5 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e pH entre 4 – 4,5.), **JNFb** (5 g L<sup>-1</sup> de ácido málico; 0,6 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,02 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 2 mL de solução de micronutrientes; 2 mL solução de azul de bromotimol; 4 mL de FeEDTA; 1 mL de solução de vitaminas, 1,8 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e pH 5,8), **NFB** (5 g L<sup>-1</sup> de ácido málico; 0,5 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g L<sup>-1</sup> NaCl; 0,02 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 2 mL de solução de micronutrientes; 2 mL solução de azul de bromotimol; 4 mL de FeEDTA; 1 mL de solução de vitaminas, 4,5 g L<sup>-1</sup> de KOH; 1,8 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e pH 6,8) e **LGI-P** (100 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,2 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,02 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,002 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 5mL de azul de bromotimol; 0,01 g L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,8 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, e pH 5,5 - 6,0). Todos os meios foram preparados de em forma semi-sólida, vertidos em tubos de penicilina, tamponados e autoclavados. Em seguida os isolados bacterianos foram inoculados em triplicada por picada e incubados a 28°C em BOD por 8 dias.

A avaliação foi realizada de forma qualitativa, observando a existência de isolados negativos e positivos, que são confirmados através da presença da película horizontal de crescimento bacteriano, característica para bactérias que fixam nitrogênio atmosférico. Também foi verificado em quais meios cada isolado conseguiu apresentar a película de fixação.

### **Produção de sideróforos**

A identificação de bactérias produtoras de sideróforos foi baseada na metodologia descrita por Schwyn e Neilands (1987) e no trabalho de Loudon et al. (2011), com modificações. Foi preparado meio TSA sólido diluído 10 vezes, para diminuir a quantidade de ferro disponível, acrescido de 0,5 g L<sup>-1</sup> de Piperazina anidra (Sigma). Concomitantemente, preparou-se o complexo CAS (Chromo azulol; brometo de cetiltrimetilâmonio e Cloreto férrico- Vetec). As soluções foram autoclavadas separadamente, após o processo de esterilização, em câmara de fluxo laminar, foram deixados até o meio TSA atingir cerca de 50°C, e assim adicionada a solução do complexo CAS e vertido em placas de petri.

Os isolados bacterianos foram inoculados em triplicata e observada qualitativamente a produção de sideróforos, isolados negativos e positivos, onde estes apresentam um halo claro, de cor amarela ou alaranjada ao redor da colônia, contrastando com a coloração azul do meio de cultura.

### **3.6 Caracterização Molecular dos isolados**

#### **Extração de DNA**

Para a caracterização molecular dos isolados, foi extraído o DNA total via metodologia descrita por Hungria et al. (2008) modificada. A extração foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Para a extração, os isolados foram inoculados em tubos contendo 5 mL de meio TSA 10% líquido e incubados por 48 horas a 28°C. Após o crescimento, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em solução de NaCl 0,85%. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm durante 10

minutos, tendo o sobrenadante descartado novamente e o precipitado ressuspenso em 400  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris.HCl; 1mM de EDTA com pH 8,0). A esta suspensão, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de SDS 10% (Dodecil sulfato de sódio), 10  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (10mg  $\text{mL}^{-1}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de lisozima (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de Ribonuclease A (10mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e incubado a 37°C por uma hora.

Após a incubação, homogeneizou-se a suspensão e adicionar 30  $\mu\text{L}$  de NaCl (5 mol  $\text{L}^{-1}$ ), 70  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio (3 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e 28  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril e deixada em repouso por 1 hora em geladeira. Após o repouso, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo, em seguida acrescentado o dobro do volume de etanol absoluto gelado ( $\pm 600\mu\text{l}$ ) e deixado em repouso no freezer durante uma noite. No dia seguinte, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante, seguido de uma lavagem do precipitado com 400  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Centrifugou-se novamente durante 5 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA seco em temperatura ambiente para em seguida ser ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de tampão TE.

Após a resuspensão, o DNA foi avaliado para verificação da qualidade e quantidade do DNA obtido. A avaliação foi realizada em gel de Agarose (1% p/v) em tampão 0,5 x TBE (1,1M Tris; 900mM ácido bórico; 25mM EDTA, a pH 8.3 – 100 mL diluído em 900 mL de água deionizada), corado com brometo de etídio (10mg  $\text{mL}^{-1}$ ) e fotodocumentado em Sistema de fotodocumentação Kodak CareStream Gel Lógic, comparando o DNA obtido com o padrão Lambda DNA (Promega) na concentração de 100 e 200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### **Análise da diversidade genética**

A avaliação da diversidade genética dos isolados foi realizado por meio da técnica BOX-PCR, utilizando o *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). A condição de reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foi a seguinte, com volume final de 25 $\mu\text{L}$ : 0,5 a 10 ng de DNA molde; 1mM de cada dNTP; 3,5mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 1x do tampão da enzima *Taq Buffer*, 1 $\mu\text{M}$  do *primer* BOX- A1R; 1x de DMSO (dimetilsulfóxido) e 0,08U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Promega). A reação de PCR foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems), com a seguinte condição de ciclo: 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 2

minutos, 92°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 45 segundos, extensão de *primer* a 65°C por 1 minuto e seguida de extensão final a 65°C por 10 minutos.

Após a amplificação, todo volume da reação foi avaliado por eletroforese em gel de Agarose a 1,5% (p/v) em tampão 0,5X TBE e corado com brometo de etídio (10mg mL<sup>-1</sup>) e fotodocumentado em Sistema de fotodocumentação Kodak CareStream Gel Logic, comparando o padrão da reação de PCR com ladder 1kb (Norgen Biotek.).

As bandas geradas pela amplificação foram transformadas em uma matriz binária e analisadas através do software Past 3.10 (Hammer et al., 2001), empregando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e aplicado o Coeficiente de Jaccard para obter-se a matriz de similaridade entre as linhagens analisadas.

### 3.7 Análises estatísticas

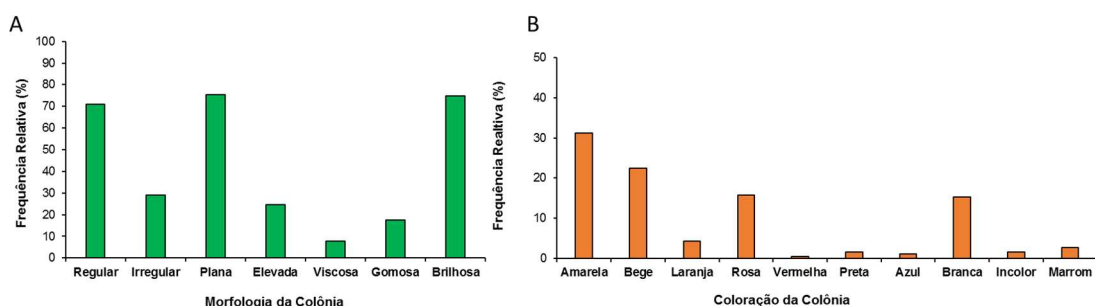
Os dados de densidade bacteriana foram transformados em Log10 para uniformizar os dados. Os dados qualitativos de isolamento, produção de sideróforos e fixação biológica de nitrogênio foram submetidos ao teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e a análise estatística descritiva por fatores e entre fatores quando cabível, utilizando o suplemento *Action* disponível no Microsoft Excel. Foram analisadas as influências dos fatores: nicho de colonização, genótipo do hospedeiro, porta-enxerto e local de coleta. Os dados quantitativos forma submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando o software R, com o pacote “Agricolae. E a o teste de Wilcoxon quando permitido, utilizando também o software R com o pacote “coin” ou ‘DeskTools”.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento

Com o isolamento de bactérias cultiváveis endofíticas de raiz, caule e folha e rizosféricas em meio não seletivo TSA 10%, obteve-se um total de 183 isolados, onde 93 pertenciam a rizosfera, 36 são endofíticos de raiz, 36 são endofíticos do caule e 18 endofíticos de folha.

Apesar de Doornbos et al. (2012) afirmar que o isolamento bacteriano tradicional, realizado em placas de petri contendo meios de cultura não seletivos, só conseguem acessar no máximo 10% comunidade bacteriana existente no solo, observou-se que os isolados encontrados, dentro da faixa dos considerados cultiváveis, mostraram grande variabilidade morfológica. Pode ser observado na Figura 1 A e B, a variação em relação a morfologia da colônia e coloração.



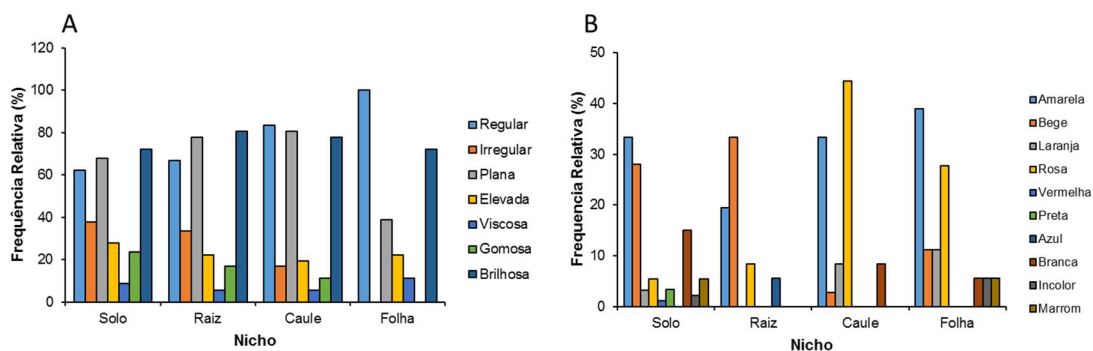
**Figura 2.** Distribuição dos isolados bacterianos encontrados em relação a A) Morfologia da colônia e B) Coloração da colônia.

Observou-se que houve a predominância de colônias bacterianas regulares, planas e brilhosas, representando 71,4%, 75,4% e 74,8% dos isolados, respectivamente. Assim como de coloração amarela, com 31,15% dos isolados, seguido de 22,40% de colônias da coloração bege. Além de colônias da coloração branca e rosa, representado cerca de 15% cada uma.

Com relação ao nicho de isolamento, observou-se que a distribuição entre os isolados bacterianos foi variável. Colônias de isolados de todos os nichos estudados foram predominantemente planas, regulares e brilhosas (Figura 2 A). A diferenciação dos nichos foi através da coloração das colônias (Figura 2 B), onde no nicho solo, houve predominância de isolados com coloração amarela e

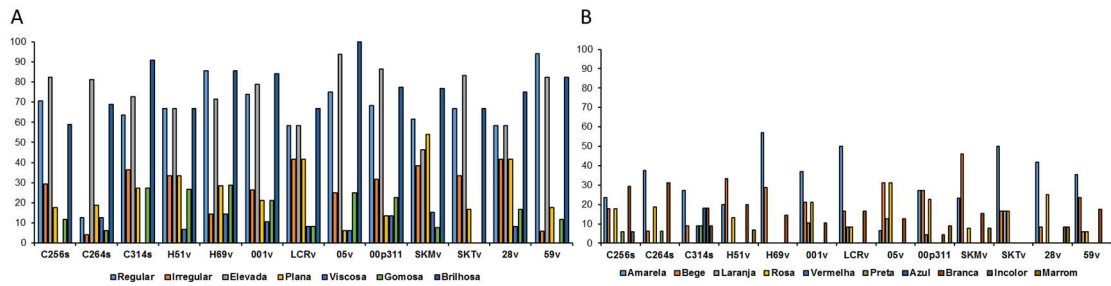


bege, com distribuição de 33,33% e 27,8%, respectivamente. Enquanto que, para o nicho raiz, destacaram-se colônias de coloração bege e branca, com 33,33% e 27,4%. Para o nicho caule, predominaram isolados de coloração rosa (44,44%) e amarela (33,33%), assim como para o nicho folha, com colônias de coloração amarela predominado, com 38,9% dos isolados, seguido de 27,5% para as de coloração rosa.



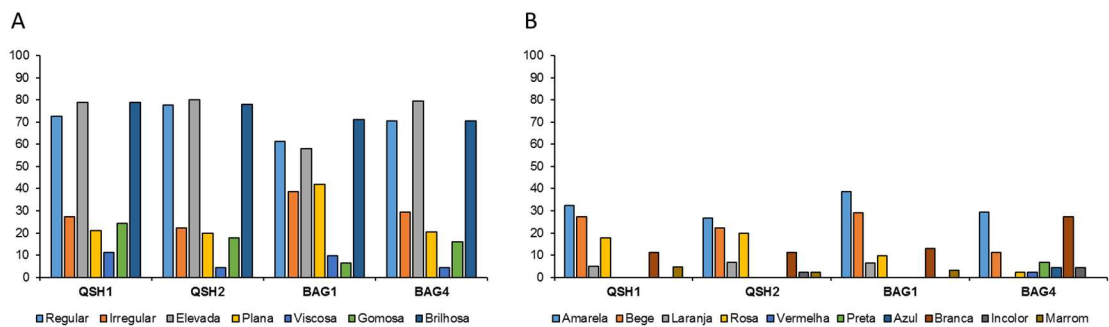
**Figura 3.** Distribuição dos isolados bacterianos em relação aos nichos de isolamento. Foram avaliadas A) Morfologia da colônia e B) Coloração da colônia. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos de isolamento ( $p < 0,05$ ).

Com a Figura 4, observou-se que não houve grande diferenciação dos isolados quando levada em consideração a combinação genótipo e porta-enxerto em relação a morfologia da colônia. Em todas as combinações, destacaram-se isolados de colônia regular, elevada e brilhosa. Com exceção para a combinação Sunki Maravilha com porta-enxerto Volkameriano, onde colônias de morfologia plana se sobressaíram as elevadas com 53,9% e 46,2, respectivamente (Figura 3A). Em relação a coloração da colônia (Figura 3B), notou-se que há uma maior diferenciação entre as combinações, apesar de colônias de coloração amarela, bege e branca se sobressaírem com relação as demais



**Figura 4.** Distribuição dos isolados bacterianos em relação a combinação genótipo e porta-enxerto. Foram avaliadas **A)** Morfologia da colônia e **B)** Coloração da colônia. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência da combinação entre genótipo e porta-enxerto ( $p < 0,05$ ).

Já a Figura 5 mostra a diferença entre as colônias por local de isolamento. Apesar dos locais de coleta estarem dispostos sobre o mesmo tipo de solo, que é um Latossolo Amarelo distrocoeso, observa-se que as bactérias isoladas do BAG4, apesar da dominância das colorações amarela e branca, mostraram maior distribuição com relação as outras colorações (Figura 4B). Já com relação a morfologia, bactérias com colônia regular, elevadas e brilhosa foram dominantes.



**Figura 5.** Distribuição dos isolados bacterianos em relação ao local de coleta das amostras. Foram avaliadas a **A)** Morfologia da colônia e **B)** Coloração da colônia. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos locais de coleta ( $p < 0,05$ ).

As variações tanto morfológicas quanto em coloração encontradas nos isolados avaliados indicam que há diferenciação entre os gêneros ou espécies que interagem com as plantas de citros estudadas. Observou-se também que existem os grupos que são morfológicamente dominantes, aparecendo com maior frequência nas variáveis estudadas, no entanto, isto não indica que

pertencam aos mesmos grupos genéticos. Hung e Annapurna (2004) afirmam que a variação nas características morfológicas de bactérias associadas a plantas de citros pode variar com a especificidade bactéria – hospedeiro e também do tipo de tecido do qual as bactérias foram isoladas.

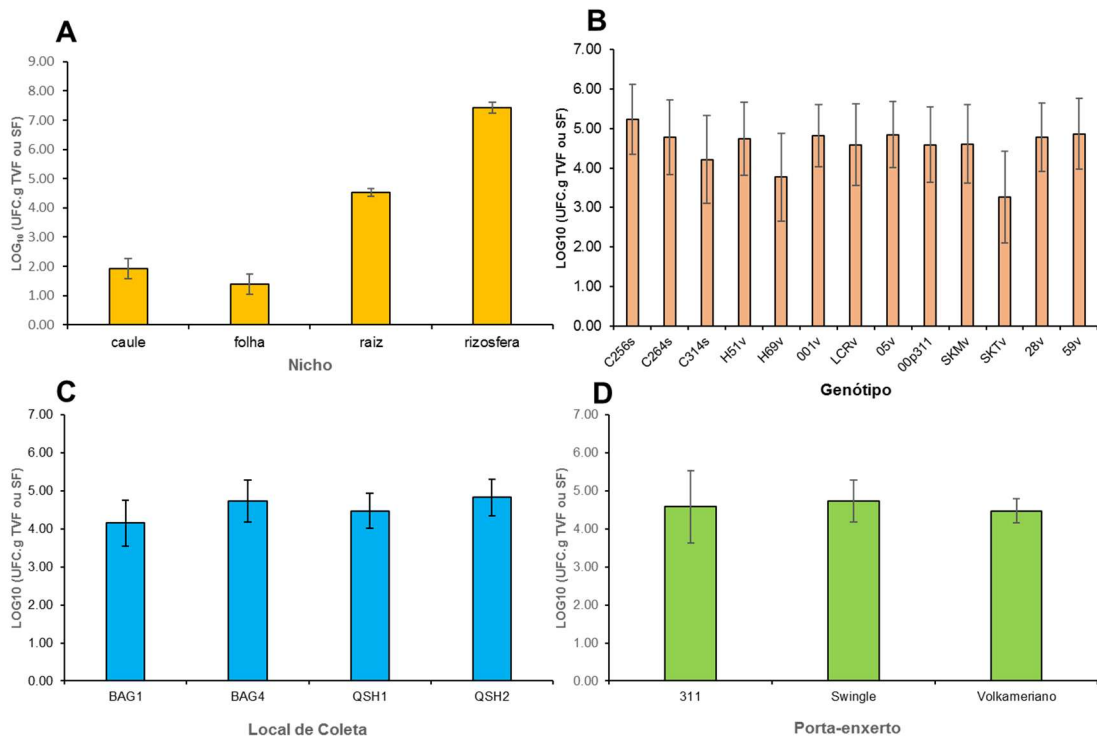
Todas as avaliações de distribuição dos isolados foram submetidas ao teste de  $\chi^2$ , que mostrou haver influência dos nichos, locais de coleta e combinação de genótipo e porta-enxerto na morfologia e coloração das colônias ( $p < 0.05$ ).

A avaliação da densidade bacteriana mostrou que apenas os nichos de isolamento exerceram influência na comunidade bacteriana associada plantas de citros ao nível de 5 % de significância (Kruskal-Wallis:  $\chi^2 = 103.5935$ ,  $gl = 3$ ,  $p\text{-valor} = 0.000$ ). Efeito que foi confirmado pela aplicação do teste de Wilcoxon ( $p\text{-valor} = < 2.2e-16$ ) mesmo sendo significativo.

A Figura 6 mostra a média e o desvio padrão da média dos dados de densidade bacteriana. Observando as médias da densidade em relação ao nicho de isolamento (Figura 6A), verificou-se que a rizosfera se sobressaiu, com média de  $7,44 \text{ Log}_{10} (\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} \text{SF})$ , seguido da raiz, apresentado densidade média de  $4,53 \text{ Log}_{10} (\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} \text{TVF})$ , exercendo maior influência na comunidade bacteriana associada.

Apesar de ser observada diferença entre as médias de densidade de isolamento com relação a combinação genótipo e porta-enxerto (Figura 6B), o teste de Wilcoxon mostrou que estas diferenças não são significativas ( $p = > 0,05$ ). Assim como para o efeito isolado do porta-enxerto e do local de coleta, o teste de Wilcoxon também não foi significativo ( $p = > 0,05$ ).

Com relação a combinação genótipo e porta-enxerto, não houve diferenciação estatística ( $p = > 0.05$ ), mas notou-se a variação da densidade bacteriana entre as combinações. Destacando-se a combinação Citrandarin Índio 256 sobre o porta-enxerto Swingle, com densidade aproximada de  $5,3 \text{ Log}_{10} (\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} \text{TVF})$ , enquanto que a combinação Sunki Tropical sobre o porta-enxerto Volkameriano apresentou a menor diversidade, com aproximadamente  $3,5 \text{ Log}_{10} (\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} \text{TVF})$ .



**Figura 6.** Médias da densidade bacteriana em relação **A)** nicho de isolamento; **B)** Genótipo; **C)** Local de coleta e **D)** Porta-enxerto. Médias de três repetições. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ).

A variabilidade morfológica e de cores das colônias dos isolados e a variação da densidade em relação ao nicho de isolamento demonstra a diferença que pode ser encontrada na comunidade bacteriana cultivável associada a plantas de citros. Em alguns trabalhos, como o de Hardoim et al. (2008), afirma-se que diversos fatores, como tipo de solo, genótipo do hospedeiro, clima, estação do ano, entre outros, podem afetar a comunidade bacteriana associada. Long et al. (2010) e Singh et al. (2009) afirmam que principalmente o tipo de solo pode ter influência direta na comunidade microbiana.

No presente trabalho, os pontos de coleta encontravam-se no mesmo tipo de solo. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os locais de coleta (Figura 6C), nota-se que uma pequena variação ocorreu dentro do mesmo tipo de solo, e pode ser um fator da influência do porta-enxerto e da combinação de genótipo e porta-enxerto no solo. Os exsudados liberados pelas plantas, dependendo das substâncias existentes, como os tipos de aminoácidos e ácidos orgânicos, podem afetar o pH, por exemplo, e assim inibir ou estimular

o desenvolvimento de alguns grupos bacterianos, afetando a densidade e diversidade.

Houve uma maior concentração bacteriana nos nichos rizosfera e raiz. Isto ocorre também devido ao aporte de grande quantidade de exsudados liberados pelo sistema radicular, além da deposição de células radiculares. Bacilio - Jiménez et al. (2003), em um ensaio com plântulas de arroz em condições hidropônicas, caracterizaram os exsudados liberados por estas e observaram a existência de altas concentrações de aminoácidos e carboidratos após duas semanas de cultivo. Os principais aminoácidos encontrados foram a histidina, prolina, valina, alanina e glicina. Enquanto que os principais tipos de carboidratos encontrados foram manose, galactose, glucose e ácido glucurônico. Doornbos et al. (2012) afirma que os micro-organismo podem utilizar as substâncias disponíveis como substrato para seu crescimento, e conseqüentemente aumento da biomassa ao redor das raízes e do sistema radicular como um todo.

Além da atração exercida pelos exsudados, a densidade bacteriana endofítica de raiz é maior do que no restante do hospedeiro por este ser um dos principais sítios de entrada bacteriana no interior do mesmo. Trabalhos como o conduzido por Aravind et al. (2009), estudaram a diferença em relação a comunidade bacteriana isolada em ramos e raízes de 10 genótipos de pimenta do reino, encontraram uma população média de 3–4 log (CFU g<sup>-1</sup>) para as raízes e 2–3 log (CFU g<sup>-1</sup>) para os ramos. Segundo os autores, a proximidade das raízes com o solo exerce influência na maior densidade encontrada para este nicho, confirmando os resultados encontrados no presente trabalho.

De acordo com Hardoim et al. (2008), a espécie e genótipo do hospedeiro também pode afetar a densidade e diversidade da comunidade bacteriana associada as plantas. O estudo conduzido por Ikeda et al. (2013) buscaram encontrar diferenças na comunidade bacteriana associadas a diferentes genótipos de milho, no entanto os autores não encontraram diferenças nas análises quantitativas realizadas, porém encontraram nas qualitativas, principalmente de diversidade.

Já o trabalho realizado por Overbeek e Elsas (2008), confirmaram a existência de diferença na densidade da comunidade bacteriana em relação a três diferentes genótipos de batata. Como o presente trabalho, estatisticamente não foram diferentes, no entanto, é visível a existência da variação (Tabela 3).

Andreote et al. (2008) realizaram um ensaio avaliando a densidade bacteriana associada a plantas transgênicas e selvagens de tabaco. Os autores observaram que houve influência do genótipo nas densidades bacterianas da rizosfera e do rizoplano, variando de 7.75 a 8.30 log CFU g<sup>-1</sup> para a comunidade rizosférica aos três meses de cultivo. Também observaram que a densidade variou de acordo com o hospedeiro.

Lacava et al. (2004) realizaram um estudo com tangerina (*Citrus reticulata* cv. Blanco) e laranja doce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck cv. Pêra) para determinar a população endofítica cultivável e não cultivável em galhos e folhas. Os autores realizaram o isolamento em meio TSA. Os mesmos obtiveram uma baixa incidência de bactérias cultiváveis nas folhas em relação aos ramos, assim como o encontrado neste trabalho. Também observaram que a tangerina apresentava uma menor incidência geral em relação a laranja doce. Resultado semelhante pode ser observado neste trabalho, principalmente quando comparados os genótipos.

Em estudo publicado por Pereira et al. (2016), os autores analisaram a comunidade bacteriana cultivável associada a plantas de *Lavandula dentata*. Isolaram bactérias endofíticas de folhas e raízes de plantas saudáveis em meio TSA e obtiveram a densidade de colonização na faixa 6,21 UFC.g<sup>-1</sup> PF (peso fresco) para as raízes, e 5,31 UFC.g<sup>-1</sup> para folhas, resultados estes que diferiram, principalmente, dos valores para folhas encontrados no presente trabalho. Essa diferença pode ser por conta do porte do hospedeiro. Plantas de lavanda possuem porte herbáceo, facilitando a trajetória das bactérias endofíticas no interior do hospedeiro, ou também o tipo e tamanho de folha, quantidade de estômatos, além da possível maior quantidade de metabólitos disponíveis, o que pode facilitar a entrada das bactérias do filoplano e a manutenção destas endofiticamente, aumentando a densidade.

**Tabela 3.** Média da densidade bacteriana isolados de quatro diferentes nichos de colonização de 13 combinações de genótipo e porta-enxerto.

Genótipo	PE	Nicho	Log <sub>10</sub> (UFC g <sup>-1</sup> )	Genótipo	PE	Nicho	Log <sub>10</sub> (UFC g <sup>-1</sup> )
LCR x TR - 001	Volk	Riz	7,55	HTR - 069	Volk	Riz	7,71
		R	5,06			R	4,53
		C	2,62			C	0,00
		F	4,05			F	0,00
Citrandarin San Diego 314	Swingle	Riz	8,13	TSKCX x ( TR x LCR ) 059	Volk	Riz	8,47
		R	5,41			R	5,24
		C	0,00			C	2,65
		F	2,06			F	3,23
Citrandarin Indio 256	Swingle	Riz	8,42	SK x BK - 00	311	Riz	8,32
		R	5,43			R	4,80
		C	2,59			C	3,88
		F	4,95			F	0,00
Citrandarin Riverside 264	Swingle	Riz	8,16	Sunki Tropical	Volk	Riz	8,62
		R	5,30			R	5,22
		C	4,32			C	0,00
		F	0,00			F	0,00
LRF x ( LCR x TR ) 005	Volk	Riz	7,85	Sunki Maravilha	Volk	Riz	8,40
		R	4,95			R	4,73
		C	4,04			C	3,50
		F	2,37			F	0,00
HTR - 051	Volk	Riz	8,22	Limão Cravo Santa Cruz	Volk	Riz	8,61
		R	5,18			R	5,47
		C	4,57			C	2,11
		F	0,00			F	3,05
TSKC x CTSW - 028	Volk	Riz	7,95				
		R	3,81				
		C	3,06				
		F	4,03				

**PE:** Porta-enxerto; **Volk:** Volkameriano; **RIZ:** Rizosfera; **R:** Raiz; **C:** Caule; **F:** Folha.

Em plantas lenhosas, como no trabalho desenvolvido por (Procópio *et al.*, 2009), que avaliou 6 espécies e dois híbridos de *Eucalyptus* spp., os autores observaram que a frequência de isolamento bacteriano foi diferente entre os genótipos estudados, variando de 30 a 60% em relação ao genótipo, mais uma vez confirmando resultado encontrado no presente trabalho.

#### 4.2 Produção de enzimas de importância biotecnológica

De acordo com Burns et al. (2013), a produção de enzimas extracelulares vem a ser uma estratégia da comunidade bacteriana em economizar nutrientes, sendo uma das ferramentas originadas pela seleção natural. As enzimas extracelulares podem aumentar a área útil para a captura de nutrientes e aumentar a disponibilidade destes, diminuindo o gasto energético bacteriano. Além de diminuir o gasto energético, algumas enzimas apresentam potencial para uso na indústria e como auxiliares no desenvolvimento do hospedeiro.

Além disso, dentre as características benéficas existentes na comunidade bacteriana associada as plantas, uma delas é a produção de enzimas extracelulares como a amilase, celulase e pectinases.

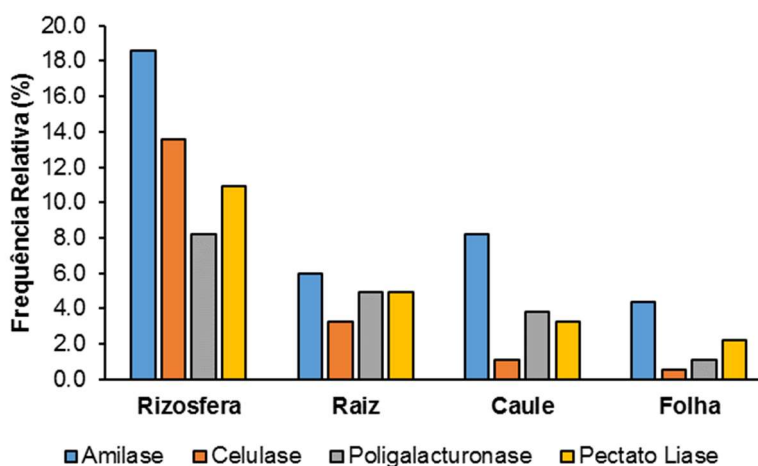
Dos 183 isolados analisados, 55,74% apresentaram capacidade de produzir uma ou mais enzimas extracelulares (Amilase, Celulase, Pectato Liase e Poligalacturonase). Na Figura 7, é mostrada a frequência de bactérias positivas por nicho avaliado para todas as enzimas, em comparação ao total de isolados. O teste de  $\chi^2$  comprova que houve diferença significativa entre as frequências encontradas ( $p=0.05$ ).

Observou-se que isolados rizosféricos e endofíticos de raiz se destacaram na como positivos na produção da maioria das enzimas. Para a produção de amilase, que as bactérias endofíticas de caule tiveram uma maior frequência para amilase (9%), superando a frequência das bactérias isoladas das raízes, sendo superada pela frequência das bactérias isoladas da rizosfera (18%). O nicho de isolamento folha mostrou as menores frequências de produção de enzimas.

Para a produção de celulase, a rizosfera destacou-se novamente, seguido dos isolados endofíticos de raiz (aproximadamente 13% e 3%, respectivamente). Em relação a distribuição da frequência das bactérias produtoras de poligalacturonase e pectato liase, o nicho rizosfera mostrou-se diferente, maior frequência de bactérias positivas para a produção de pectato liase, cerca de 11%, e menor frequência para a produção de poligalacturonase, aproximadamente 8,2%. As linhagens bacterianas isoladas das folhas apresentaram comportamento semelhante aos da rizosfera. Já as bactérias isoladas do nicho raiz, mostraram frequências semelhantes para as duas enzimas (4,92% para ambas), enquanto que caule mostrou uma frequência

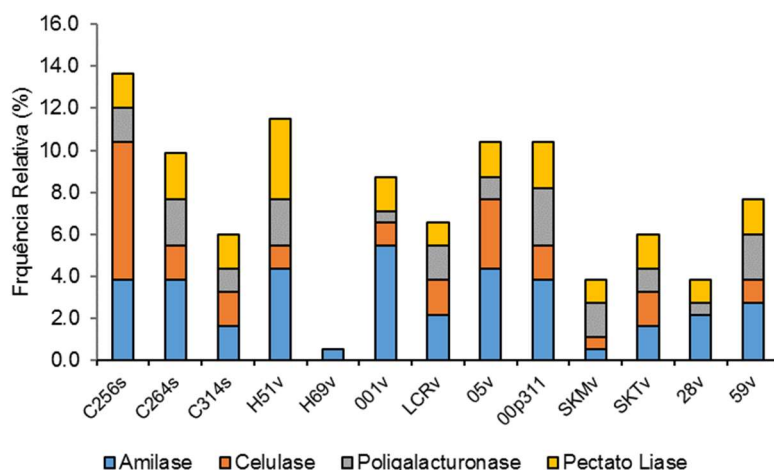


maior para poligalacturonase do que para pectato liase (3,83% e 3,28%, respectivamente). As diferenças entre as frequências foram confirmadas pelo teste de  $\chi^2$  ( $p=0,05$ ).



**Figura 7.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de enzimas em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos na frequência de bactérias positivas para a produção de enzimas ( $p<0,05$ ).

Em relação aos genótipos (Figura 8), observou-se que houve diferenças em relação a frequência de bactérias positivas por enzima, confirmadas pela aplicação do teste de  $\chi^2$ . Para amilase, destacaram-se os genótipos LCR x TR 001 (5,46%), seguido pelos genótipos LRF x (LCR x TR) 005 e HTR-051 (ambos com 4,37%). Para celulase, notou-se que os genótipos Citrandarin Índio 256 e LRF x (LCR x TR) 005 se destacaram, com 6,56% e 3,28% respectivamente. Para poligalacturonase, destacaram-se os genótipos SK x BK -00 (2,73%), seguido por Citrandarin Riverside 264, HTR-051 e TSKCX x (TR x LCR)-059 (ambos com 2,19%). Enquanto que para pectato liase, os genótipos que se destacaram foram HTR-051, com 3,83% das linhagens, seguido por Citrandarin Riverside 264, com 2,19%.



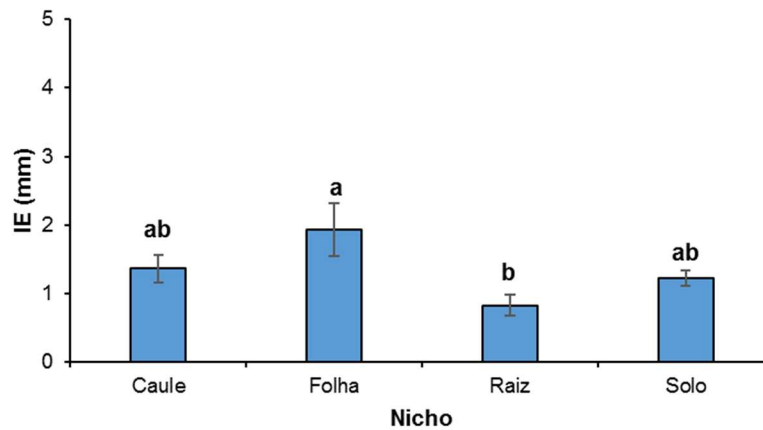
**Figura 8.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de enzimas em relação a combinação de genótipo e porta-enxerto do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência das combinações de genótipos e porta-enxertos na frequência de bactérias positivas para a produção de enzimas ( $p < 0,05$ ).

### Amilase

A atividade amilolítica foi observada em 68 isolados, equivalente a 37,16% dos 183 isolados bacterianos avaliados. A produção de amilase foi calculada através do Índice Enzimático (IE-mm).

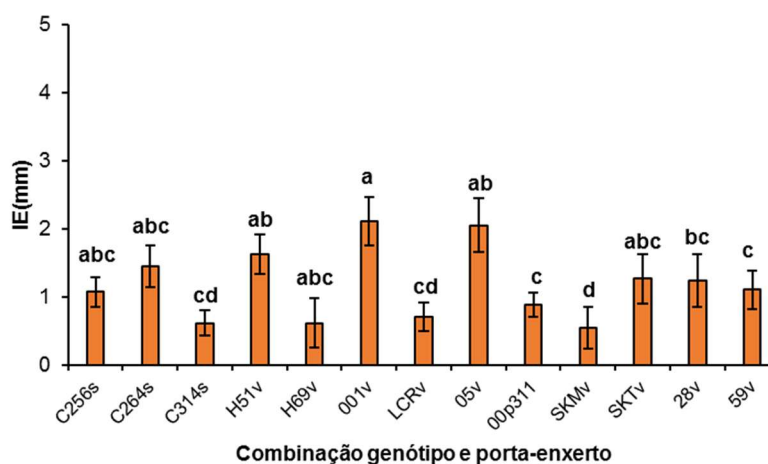
A avaliação do Índice Enzimático mostrou a combinação genótipo e porta-enxerto exerceram influência na comunidade bacteriana associada plantas de citros ao nível de 5 % de significância (Kruskal-Wallis:  $X^2 = 38,81634$ ;  $gl = 13$ ,  $p\text{-valor} = 0,0001$ ). Assim também como para o nicho de isolamento. Efeito que também foi confirmado pela aplicação do teste de Wilcoxon ( $p\text{-valor} = 2,2e-16$ ) mesmo sendo significativo.

A Figura 9 mostra os resultados para o IE médio (em mm) para o nicho de isolamento. Percebe-se que o nicho folha se sobressaiu em relação aos demais nichos, mostrando um IE médio de aproximadamente 1,95 mm, seguido dos nichos caule e solo, que não foram estatisticamente diferentes entre si (1,35 mm e 1,23 mm, respectivamente). O nicho raiz apresentou os menores IE.



**Figura 9.** Índice Enzimático amilolítico médio (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ).

A Figura 10 mostra as medias do IE em relação as combinações entre genótipo e porta-enxerto. Observa-se que houve uma grande variação, afirmada pela significância estatística. Observa-se que apenas a combinação houve diferença entre os genótipos, com LCR x TR-001 sobre Volkameriano se destacou sobre os demais, com IE médio de 2,12 mm. Mesmo a combinação LRF x (LCR x TR) 005 sobre Volkameriano não se diferenciado estatisticamente dos HTR-051 sobre Volkameriano, observa-se que o IE medido do primeiro é relativamente maior que o da segunda combinação. Já as combinações Já Citrandarin San Diego 314, HTR – 69 e Sunki Maravilha apresentaram as menores médias, com IE de 0,62 mm para os dois primeiros e 0,55mm para o último.



**Figura 10.** Índice Enzimático amilolítico médio (mm) produzido em relação a combinação genótipo e porta-enxerto para atividade amilolítica. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ).

O índice amilolítico médio por isolado pode ser observado na Tabela 4. O teste de Kruskal-Wallis confirmou a existência de significância estatística ( $p = 0,05$ ). Pode-se notar a grande diferença do IE em relação a cada isolado. Os isolados que se destacaram na produção de amilase e consequente maior IE foram os isolados EMFC116, com IE médio de 8,99 mm e o isolado EMFC142, com IE médio de 8,91 mm. E o EMFC99, com IE de 7,18 mm. O primeiro isolado foi oriundo do nicho folha do genótipo LCR x TR – 001 em combinação com o porta-enxerto Volkameriano, o segundo foi oriundo do nicho caule do genótipo LRF x (LCR x TR) 005 em combinação com o porta-enxerto Volkameriano. Já o terceiro foi originado da rizosfera do genótipo Citrandarin San Diego 314 com combinação com o porta-enxerto Swingle.

De acordo com a produção de amilases, observou-se que as bactérias endofíticas oriundas das folhas apresentaram maior IE quando comparada a outros nichos. Isso pode ocorrer pela pouca disponibilidade de amido nas folhas. Segundo o trabalho realizado por Cruz et al. (2007), raízes de plantas cítricas apresentam teores de amido maiores que nas folhas. A pouca disponibilidade deste amido pode estimular as bactérias endofíticas de folha a produzir amilases e assim capturar o amido necessário para seu desenvolvimento. Enquanto que as bactérias endofíticas de raízes apresentaram o menor IE, isso se deve também a presença de altas concentrações de amido disponível.

**Tabela 4.** Índice Enzimático para a produção de amilase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros.

Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio
	(mm)		(mm)		(mm)		(mm)
EMFC1	0.00 E	EMFC30	0.00 E	EMFC57	4.56 E	EMFC90	2.46 E
EMFC2	0.00 E	EMFC31	3.83 hij	EMFC58	3.88 defgh	EMFC91	2.87 pqrs
EMFC3	2.92 lmn	EMFC32	0.00 E	EMFC59	6.65 hij	EMFC92	0.00 lmno
EMFC5	4.69 defgh	EMFC33	2.03 stuvw	EMFC60	0.00 cdef	EMFC93	0.00 E
EMFC6	2.05 tuvw	EMFC34	1.73 wxyz	EMFC62	5.90 E	EMFC94	0.00 E
EMFC7	3.80 hij	EMFC35	0.00 E	EMFC66	2.40 abcd	EMFC95	0.00 E
EMFC8	0.00 E	EMFC35	0.00 E	EMFC67	1.67 pqrst	EMFC96	0.00 E
EMFC9	0.00 E	EMFC36	0.00 E	EMFC68	0.00 wxyzAB	EMFC97	0.00 E
EMFC10	2.27 qrstu	EMFC37	0.00 E	EMFC69	0.00 E	EMFC98	0.00 E
EMFC11	0.00 E	EMFC38	0.00 E	EMFC70	0.00 E	EMFC99	7.18 ab
EMFC12	0.00 E	EMFC40	0.00 E	EMFC71	0.00 E	EMFC100	3.60 E
EMFC13	0.00 E	EMFC41	5.40 E	EMFC72	2.22 E	EMFC101	0.00 ijk
EMFC14	0.00 E	EMFC42	0.00 bcde	EMFC73	0.00 rstuv	EMFC103	0.00 E
EMFC15	0.00 E	EMFC43	0.00 E	EMFC74	0.00 E	EMFC105	0.00 E
EMFC16	1.47 yzABCD	EMFC44	0.00 E	EMFC75	0.00 E	EMFC106	0.00 E
EMFC17	4.41 efgh	EMFC45	0.00 E	EMFC77	0.00 E	EMFC107	0.00 E
EMFC18	0.00 E	EMFC47	0.00 E	EMFC78	1.42 E	EMFC108	0.00 E
EMFC21	0.00 E	EMFC48	0.00 E	EMFC80	0.00 ABCD	EMFC109	4.06 E
EMFC22	0.00 E	EMFC49	3.10 E	EMFC82	1.30 E	EMFC110	5.20 ghi
EMFC23	0.00 E	EMFC50	0.00 lmn	EMFC83	3.27 CD	EMFC111	1.48 cdefg
EMFC24	2.85 lmno	EMFC51	2.70 E	EMFC84	1.38 jkl	EMFC112	0.00 yzABC
EMFC25	3.03 klm	EMFC52	0.00 mnop	EMFC85	0.00 ABCD	EMFC114	0.00 E
EMFC26	1.77 vwxy	EMFC53	0.00 E	EMFC86	0.00 E	EMFC115	0.00 E
EMFC27	0.00 E	EMFC55	6.46 E	EMFC87	0.00 E	EMFC116	8.99 a
EMFC28	4.71 defgh	EMFC56	0.00 abc	EMFC88	0.00 E	EMFC117	5.87 E

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4. Cont...**

Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio
	(mm)		(mm)		(mm)		(mm)
EMFC118	0.00 abcd	EMFC145	2.40 pqrst	EMFC171	0.00 E	EMFC205	2.90 lmno
EMFC119	5.36 E	EMFC146	0.00 E	EMFC172	0.00 E	EMFC206	0.00 E
EMFC120	1.50 cdef	EMFC147	0.00 E	EMFC174	0.00 E	EMFC207	0.00 E
EMFC122	0.00 yzABCD	EMFC148	0.00 E	EMFC176	1.49 zABCD	EMFC208	0.00 E
EMFC123	0.00 E	EMFC149	0.00 E	EMFC177	0.00 E	EMFC209	0.00 E
EMFC124	0.00 E	EMFC150	0.00 E	EMFC178	2.63 mnopq	EMFC212	0.00 E
EMFC125	4.75 E	EMFC151	4.64 efgh	EMFC179	0.00 E	EMFC214	1.37 BCD
EMFC126	0.00 defgh	EMFC152	0.00 E	EMFC180	3.14 jkl	EMFC215	1.48 zABCD
EMFC127	0.00 E	EMFC153	0.00 E	EMFC181	0.00 E		
EMFC128	0.00 E	EMFC154	0.00 E	EMFC182	0.00 E		
EMFC129	1.52 E	EMFC156	1.85 uvwx	EMFC183	3.82 jkl		
EMFC130	0.00 yzABCD	EMFC157	0.00 E	EMFC184	2.83 lmno		
EMFC131	0.00 E	EMFC158	2.56 nopqr	EMFC185	4.44 lmno		
EMFC132	1.62 E	EMFC159	0.00 E	EMFC186	0.00 E		
EMFC133	0.00 xyzAB	EMFC160	0.00 E	EMFC189	0.00 E		
EMFC134	0.00 E	EMFC161	5.70 abcde	EMFC191	4.35 ghi		
EMFC136	0.00 E	EMFC162	0.00 E	EMFC192	0.00 E		
EMFC137	2.54 opqr	EMFC163	4.58 fghi	EMFC193	0.00 E		
EMFC138	0.00 E	EMFC164	1.78 wxyzA	EMFC194	0.00 E		
EMFC139	3.76 hij	EMFC165	0.00 E	EMFC197	0.00 E		
EMFC140	2.01 stuvw	EMFC166	0.00 E	EMFC199	0.00 E		
EMFC141	2.87 lmno	EMFC167	1.65 wxyzAB	EMFC200	0.00 E		
EMFC142	8.91 a	EMFC168	0.00 E	EMFC202	0.00 E		
EMFC143	2.05 stuvw	EMFC169	0.00 E	EMFC203	1.15 D		
EMFC144	0.00 E	EMFC170	0.00 E	EMFC204	0.00 E		

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Observa-se que os genótipos combinados como porta-enxerto Volkameriano apresentaram os maiores IE. Isso pode ter ocorrido pelo mesmo apresentar menores concentrações de amido como um todo e assim estimular a produção da enzima amilase pela comunidade associada.

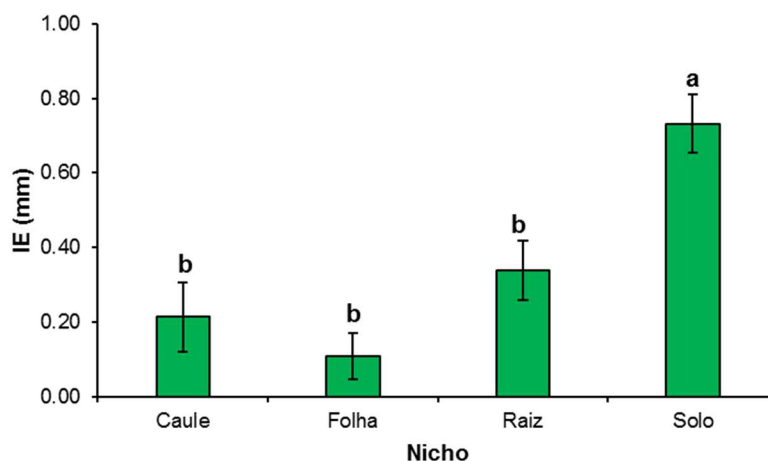
Carrim et al.(2006) avaliaram a produção de enzimas por isolados de folhas e caules de *Jacaranda decurrens*. Os autores encontraram a atividade amilolítica em 60% dos isolados avaliados, proporção bem maior quando comparada com a encontrada no presente trabalho. Já quando ao IE, os autores encontraram índices máximos por isolado de 2.6, enquanto que no presente trabalho, encontrou-se índices máximos próximos a 10,0 para isolados de caule e folha.

## Celulase

A atividade celulolítica foi observada em 34 isolados, cerca de 18.5 % dos 183 isolados estudados. A produção de celulase foi calculada através do Índice Enzimático (IE-mm).

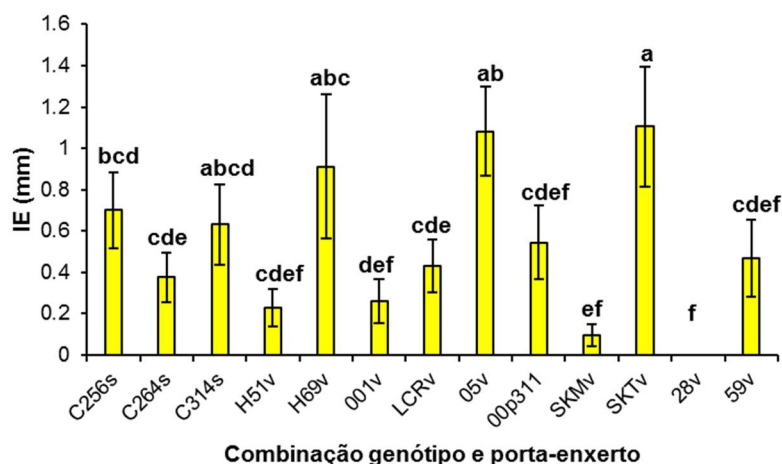
A avaliação do Índice Enzimático mostrou tanto a combinação genótipo e porta-enxerto quanto o nicho exerceram influência na comunidade bacteriana associada plantas de citros ao nível de 5 % de significância, onde Kruskal-Wallis:  $X^2 = 31,7409$ ;  $gl = 3$ ,  $p\text{-valor} = 5,935e^{-07}$ ) para o nicho de isolamento e para o genótipo, onde Kruskal-Wallis:  $X^2 = 44,88427$ ;  $gl = 12$ ,  $p\text{-valor} = 1,07862e^{-05}$ ). Efeito que também foi confirmado pela aplicação do teste de Wilcoxon ( $p\text{-valor} = 2.2e^{-16}$ ).

A Figura 11 mostra os resultados para o IE médio (em mm) para o nicho de isolamento. Percebe-se que o nicho solo se sobressaiu em relação aos demais nichos, mostrando um IE médio próximo a 1,0 mm, seguido dos nichos raiz e caule. Apesar de não serem estatisticamente diferentes entre si e entre o nicho folha, nota-se que há uma diferenciação visual, onde o nicho folha apresenta IE celulolítico médio abaixo de 0,2 mm, sendo o mais baixo entre os nichos avaliados.



**Figura 11.** Índice Enzimático celulolítico médio (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ).

A Figura 12 mostra as médias do IE em relação as combinações entre genótipo e porta-enxerto. Observa-se que houve uma grande variação, afirmada pela significância estatística. Observa-se que apenas a combinação Sunki Maravilha sobre Volkameriano se destacou sobre os demais, com IE médio de 1,2 mm. Mesmo a combinação LRF x (LCR x TR) 005 sobre Volkameriano não se diferenciou estatisticamente dos HTR-069 sobre Volkameriano, observou-se que o IE médio do primeiro, assim como para amilase, é relativamente maior que o da segunda combinação. Já as combinações HTR – 51 e Sunki Maravilha apresentaram as menores médias, com IE de aproximadamente 0,30 mm para o primeiro e abaixo de 0,20mm para o último. A combinação SKCxCTSW-028 sobre Volkameriano mostrou o pior desempenho, com nenhum isolado produzindo celulases.



**Figura 12.** Índice Enzimático celulolítico médio (mm) produzido em relação a combinação genótipo e porta-enxerto para atividade celulolítica. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ).

O índice enzimático por isolado é mostrado na Tabela 5. O isolado EMFC135 apresentou um IE de 5,51 mm, e o mesmo foi originado do caule do genótipo SK x BK-00, seguida pelos isolados EMFC23, com o segundo maior IE de, 4,22 mm e seguido pelo EMFC36, com IE de 4,20 mm, onde o primeiro foi originado da rizosfera do genótipo TSKCX x ( TR x LCR ) 059 e o segundo também do solo, só que do genótipo HTR-69.



**Tabela 5.** Índice Enzimático para a produção de celulase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros.

Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio
	(mm)		(mm)		(mm)		(mm)
EMFC1	0.00 S	EMFC30	1.96 lmn	EMFC58	0.00 s	EMFC91	2.21 jkl
EMFC2	0.00 S	EMFC31	0.00 s	EMFC59	0.00 s	EMFC92	1.43 qr
EMFC3	0.00 S	EMFC32	0.00 s	EMFC60	0.00 s	EMFC93	0.00 s
EMFC5	0.00 S	EMFC33	0.00 s	EMFC62	0.00 s	EMFC94	0.00 s
EMFC6	3.48 Cde	EMFC34	0.00 s	EMFC66	0.00 s	EMFC95	0.00 s
EMFC7	0.00 S	EMFC35	0.00 s	EMFC67	0.00 s	EMFC96	0.00 s
EMFC8	0.00 S	EMFC36	4.20 bcd	EMFC68	0.00 s	EMFC97	0.00 s
EMFC9	0.00 S	EMFC37	0.00 s	EMFC69	0.00 s	EMFC98	0.00 s
EMFC10	0.00 S	EMFC38	0.00 s	EMFC70	3.76 bc	EMFC99	0.00 s
EMFC11	0.00 S	EMFC40	0.00 s	EMFC71	0.00 s	EMFC100	0.00 s
EMFC12	3.35 Cde	EMFC41	0.00 s	EMFC72	0.00 s	EMFC101	0.00 s
EMFC13	3.21 Ef	EMFC42	0.00 s	EMFC73	0.00 s	EMFC103	1.69 pq
EMFC14	2.83 Gh	EMFC43	0.00 s	EMFC74	0.00 s	EMFC105	0.00 s
EMFC15	0.00 S	EMFC44	3.30 def	EMFC75	0.00 s	EMFC106	0.00 s
EMFC16	0.00 S	EMFC45	0.00 s	EMFC77	0.00 s	EMFC107	0.00 s
EMFC17	0.00 S	EMFC47	0.00 s	EMFC78	0.00 s	EMFC108	0.00 s
EMFC18	0.00 S	EMFC48	0.00 s	EMFC80	0.00 s	EMFC109	1.74 op
EMFC21	0.00 S	EMFC49	0.00 s	EMFC82	0.00 s	EMFC110	1.74 op
EMFC22	2.17 Klm	EMFC50	2.99 fg	EMFC83	0.00 s	EMFC111	0.00 s
EMFC23	4.22 Ab	EMFC51	0.00 s	EMFC84	0.00 s	EMFC112	0.00 s
EMFC24	3.00 Fg	EMFC52	0.00 s	EMFC85	2.46 ij	EMFC114	0.00 s
EMFC25	0.00 S	EMFC53	1.86 no	EMFC86	0.00 s	EMFC115	0.00 s
EMFC26	0.00 S	EMFC55	2.21 jkl	EMFC87	1.41 r	EMFC116	0.00 s
EMFC27	3.88 B	EMFC56	0.00 s	EMFC88	2.13 klm	EMFC117	0.00 s
EMFC28	3.06 Efg	EMFC57	3.77 bc	EMFC90	0.00 s	EMFC118	0.00 s

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5. Cont...**

Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio	Isolado	IE médio
	(mm)		(mm)		(mm)		(mm)
EMFC119	0.00 S	EMFC145	0.00 s	EMFC171	0.00 s	EMFC205	2.55 hi
EMFC120	0.00 S	EMFC146	0.00 s	EMFC172	0.00 s	EMFC206	0.00 s
EMFC122	0.00 S	EMFC147	0.00 s	EMFC174	0.00 s	EMFC207	0.00 s
EMFC123	1.96 mno	EMFC148	0.00 s	EMFC176	3.06 efg	EMFC208	0.00 s
EMFC124	0.00 S	EMFC149	2.16 jkl	EMFC177	0.00 s	EMFC209	1.23 r
EMFC125	0.00 S	EMFC150	0.00 s	EMFC178	0.00 s	EMFC212	0.00 s
EMFC126	0.00 S	EMFC151	0.00 s	EMFC179	0.00 s	EMFC214	1.68 op
EMFC127	0.00 S	EMFC152	0.00 s	EMFC180	0.00 s	EMFC215	0.00 s
EMFC128	0.00 S	EMFC153	0.00 s	EMFC181	0.00 s		
EMFC129	0.00 S	EMFC154	0.00 s	EMFC182	1.27 r		
EMFC130	0.00 S	EMFC156	0.00 s	EMFC183	0.00 s		
EMFC131	0.00 S	EMFC157	0.00 s	EMFC184	0.00 s		
EMFC132	0.00 S	EMFC158	0.00 s	EMFC185	0.00 s		
EMFC133	0.00 S	EMFC159	0.00 s	EMFC186	0.00 s		
EMFC134	0.00 S	EMFC160	0.00 s	EMFC189	0.00 s		
EMFC135	5.52 A	EMFC161	0.00 s	EMFC191	0.00 s		
EMFC136	0.00 S	EMFC162	0.00 s	EMFC192	0.00 s		
EMFC137	0.00 S	EMFC163	0.00 s	EMFC193	0.00 s		
EMFC138	0.00 S	EMFC164	0.00 s	EMFC194	0.00 s		
EMFC139	0.00 S	EMFC165	0.00 s	EMFC197	0.00 s		
EMFC140	0.00 S	EMFC166	0.00 s	EMFC199	0.00 s		
EMFC141	0.00 S	EMFC167	0.00 s	EMFC200	0.00 s		
EMFC142	0.00 S	EMFC168	0.00 s	EMFC202	0.00 s		
EMFC143	0.00 S	EMFC169	0.00 s	EMFC203	2.39 jk		
EMFC144	0.00 S	EMFC170	0.00 s	EMFC204	0.00 s		

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Observando os dados da produção de celulases, nota-se que o IE foi maior para bactérias da rizosfera do que nos outros nichos. Este fato pode ser explicado pela grande quantidade de matéria orgânica não decomposta ou em decomposição existente neste nicho, estimulando a comunidade bacteriana a produzir uma maior quantidade de celulases para auxiliar na quebra do material lignificado (rico em celulose – carboximetilcelulose no caso deste trabalho) disponível e posterior mineralização do mesmo Sanomiya e Nahas (2003).

Além disso, observa-se que os isolados do nicho folha apresentaram os menores valores, vide que neste ambiente, só seria necessária a produção de celulases caso a bactéria endofítica de folha tenha potencial para agente de controle biológico, auxiliando na colonização do endófito dentro do hospedeiro. No entanto Bach et al. (2016) afirmam que celulases podem afetar a parede

celular dos patógenos, mas não estão diretamente consideradas como agentes de controle biológico. Torres et al. (2008) afirmam que a produção de celulase pode mudar de acordo com o hospedeiro, confirmando o resultado encontrado no presente trabalho.

Observa-se no trabalho realizado por Torres et al. (2008), que as bactérias isoladas dos indivíduos estudados (cacau citros, eucalipto e cana-de-açúcar), apresentaram variação nos IE para a produção de celulase, onde o IE de aproximadamente 1,0 para cacau e 2,0 para cana-de-açúcar. Confirmando que a combinação genótipo e porta-enxerto estudada neste trabalho influencia no IE encontrado.

O trabalho realizado por Jalgaonwala e Mahajan (2011), encontrou índices que variaram de 0,6 a 2,1 para isolados oriundos de sete plantas medicinais diferentes. Os autores observaram que os índices variaram quanto ao hospedeiro e ao nicho selecionado para o isolamento. Estes resultados diferem quanto ao Índice enzimático dos encontrado no presente trabalho, que variou de até próximo de 10,0 para amilase e até próximo de 6,0 para celulase, no entanto, confirma mais uma vez a influência do hospedeiro na comunidade bacteriana associada.

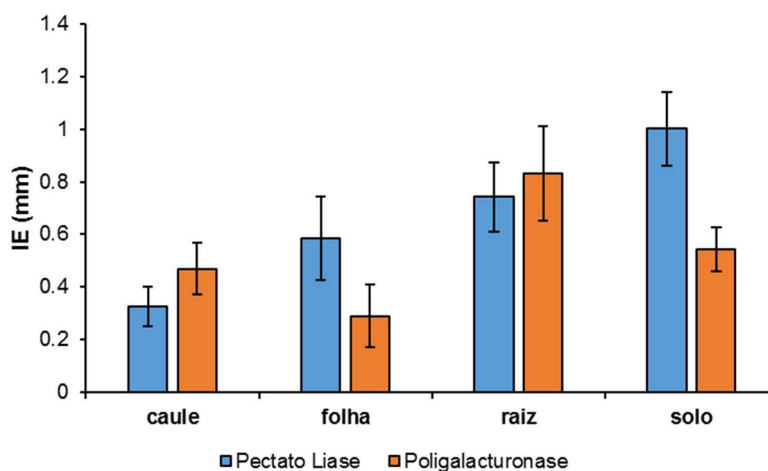
### **Pectinases**

Com relação a produção de pectinases (Poligalacturonase e Pectato Liase), 33 isolados produziram poligalacturonase e 39 produziram pectato liase, o que equivale a 18,03% e 21,31% dos 183 isolados avaliados, respectivamente.

A avaliação do Índice Enzimático mostrou que a combinação genótipo e porta-enxerto exerceram influência na comunidade bacteriana associada plantas de citros ao nível de 5 % de significância, onde Kruskal-Wallis:  $X^2 = 22,201$  gl= 13, p-valor=0,026 para a poligalacturonase, Kruskal-Wallis:  $X^2 = 41,993$ ; gl= 13, p-valor=03.340e<sup>-05</sup> para a Pectato Liase. Segundo o teste de Kruskal-Wallis, o nicho não exerceu influência na produção de poligalacturonase (p=0,113) e nem de pectato liase (p=0,28).

Mesmo não apresentando diferença estatística, a Figura 13 mostra o IE médio da produção de pectinases com relação ao nicho de isolamento. Observa-se que maiores IE foram apresentados por bactérias isoladas do solo rizosférico,

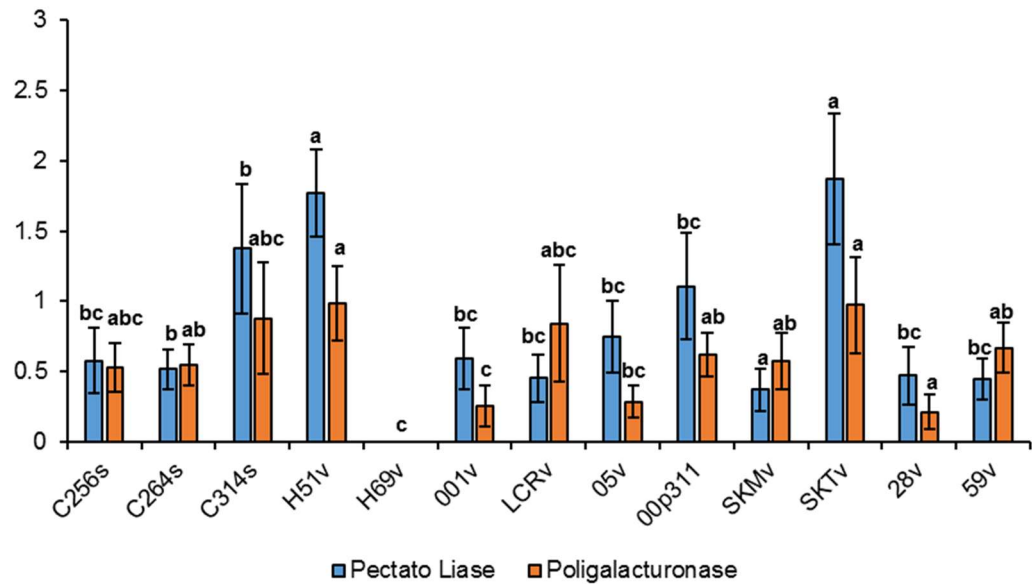
com IE médio 1,0 mm, seguido do nicho raiz (com IE médio de aproximadamente 0,75 mm) e folhas (com IE médio de aproximadamente 0,56 mm).



**Figura 13.** Índice Enzimático médio para pectato liase e poligalacturonase (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que não houve influência do nicho de isolamento ( $p>0,05$ ).

A Figura 14 mostra as médias do IE em relação as combinações entre genótipo e porta-enxerto. Observa-se que houve uma grande variação, afirmada pelo teste estatístico. Observa-se que, apenas a combinação Sunki Tropical sobre Volkameriano destacou-se sobre os demais, com IE médio de próximo de 2 mm para a produção de pectato liase. Assim também como a combinação HTR – 51 sobre Volkameriano, que apresentou um índice médio de 1,8 mm. Para a poligalacturonase, se sobressaíram novamente a Sunki Tropical sobre Volkameriano e a HTR – 51 sobre Volkameriano, as duas com IE médio próximo de 1 mm.

Como foram avaliados dois tipos de pectinases (poligalacturonase e pectato liase), a produção das duas não é dependente, ou seja, um isolado pode produzir um tipo e outro não, como no caso dos isolados dos genótipos Citrandarin Riverside 264, HTR – 051 e LCR x TR – 001. A combinação HTR-069 sobre Volkameriano não apresentou produção de nenhuma das duas enzimas.



**Figura 14.** Índice Enzimático médio para pectato liase e poligalacturonase (mm) produzido em relação a combinação genótipo e porta-enxerto. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ).

A Tabelas 6 e 7 mostram o Índice Enzimático para a produção de poligalacturonase e pectato liase. Para poligalacturonase (Tabela 6) os isolados destacaram-se os isolados EMFC215 e EMFC 92, ambos com IE acima de 7.0. O primeiro isolado endofítico de raiz do oriundo do genótipo Limão Cravo Santa Cruz, e o segundo oriundo da rizosfera do genótipo Citrandarin San Diego 314. O IE mais baixo dentre as positivas foi obtido do isolado EMFC206, com IE de 1,25, o mesmo é endofítico de raiz do genótipo Sunki Tropical.

**Tabela 6.** Índice Enzimático para a produção de poligalacturonase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros, cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Isolado	IE médio		Isolado	IE médio		Isolado	IE médio		Isolado	IE médio	
	(mm)			(mm)			(mm)			(mm)	
EMFC1	0.00	n	EMFC33	0.00	n	EMFC68	0.00	n	EMFC100	0.00	n
EMFC2	0.00	n	EMFC34	3.29	f	EMFC69	0.00	n	EMFC101	0.00	n
EMFC3	2.08	i	EMFC35	0.00	n	EMFC70	0.00	n	EMFC103	0.00	n
EMFC5	2.01	ijk	EMFC36	0.00	n	EMFC71	0.00	n	EMFC105	0.00	n
EMFC6	0.00	n	EMFC37	0.00	n	EMFC72	0.00	n	EMFC106	0.00	n
EMFC7	0.00	n	EMFC38	0.00	n	EMFC73	0.00	n	EMFC107	0.00	n
EMFC8	0.00	n	EMFC40	0.00	n	EMFC74	0.00	n	EMFC108	0.00	n
EMFC9	0.00	n	EMFC41	0.00	n	EMFC75	0.00	n	EMFC109	0.00	n
EMFC10	4.86	ab	EMFC42	0.00	n	EMFC77	0.00	n	EMFC110	0.00	n
EMFC11	0.00	n	EMFC43	0.00	n	EMFC78	0.00	n	EMFC111	0.00	n
EMFC12	0.00	n	EMFC44	0.00	n	EMFC80	4.22	bcd	EMFC112	0.00	n
EMFC13	0.00	n	EMFC45	0.00	n	EMFC82	0.00	n	EMFC114	0.00	n
EMFC14	0.00	n	EMFC47	0.00	n	EMFC83	0.00	n	EMFC115	0.00	n
EMFC15	0.00	n	EMFC48	0.00	n	EMFC84	0.00	n	EMFC116	0.00	n
EMFC16	0.00	n	EMFC49	0.00	n	EMFC85	2.55	gh	EMFC117	0.00	n
EMFC17	2.54	gh	EMFC50	0.00	n	EMFC86	0.00	n	EMFC118	0.00	n
EMFC18	0.00	n	EMFC51	0.00	n	EMFC87	0.00	n	EMFC119	0.00	n
EMFC21	0.00	n	EMFC52	4.22	bc	EMFC88	0.00	n	EMFC120	0.00	n
EMFC22	0.00	n	EMFC53	0.00	n	EMFC90	0.00	n	EMFC122	0.00	n
EMFC23	0.00	n	EMFC55	0.00	n	EMFC91	1.90	ijkl	EMFC123	1.74	lm
EMFC24	2.11	i	EMFC56	0.00	n	EMFC92	7.77	a	EMFC124	0.00	n
EMFC25	2.72	gh	EMFC57	0.00	n	EMFC93	0.00	n	EMFC125	0.00	n
EMFC26	0.00	n	EMFC58	2.84	g	EMFC94	0.00	n	EMFC126	0.00	n
EMFC27	0.00	n	EMFC59	0.00	n	EMFC95	0.00	n	EMFC127	3.49	cdef
EMFC28	0.00	n	EMFC60	0.00	n	EMFC96	0.00	n	EMFC128	0.00	n
EMFC30	0.00	n	EMFC62	0.00	n	EMFC97	0.00	n	EMFC129	0.00	n
EMFC31	2.46	gh	EMFC66	4.92	ab	EMFC98	0.00	n	EMFC130	0.00	n
EMFC32	0.00	n	EMFC67	0.00	n	EMFC99	0.00	n	EMFC131	0.00	n

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Kruskal -Wallis ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6. Cont...**

Isolado	IE médio		Isolado	IE médio		Isolado	IE médio	
	(mm)			(mm)			(mm)	
EMFC132	0.00	n	EMFC161	0.00	n	EMFC194	0.00	n
EMFC133	0.00	n	EMFC162	0.00	n	EMFC197	0.00	n
EMFC134	0.00	n	EMFC163	0.00	n	EMFC199	0.00	n
EMFC135	0.00	n	EMFC164	0.00	n	EMFC200	0.00	n
EMFC136	0.00	n	EMFC165	0.00	n	EMFC202	2.49	h
EMFC137	3.59	def	EMFC166	0.00	n	EMFC203	3.35	f
EMFC138	1.67	jkl	EMFC167	0.00	n	EMFC204	0.00	n
EMFC139	0.00	n	EMFC168	0.00	n	EMFC205	0.00	n
EMFC140	0.00	n	EMFC169	0.00	n	EMFC206	1.25	m
EMFC141	0.00	n	EMFC170	0.00	n	EMFC207	2.36	h
EMFC142	0.00	n	EMFC171	0.00	n	EMFC208	0.00	n
EMFC143	0.00	n	EMFC172	0.00	n	EMFC209	3.83	def
EMFC144	0.00	n	EMFC174	0.00	n	EMFC212	0.00	n
EMFC145	0.00	n	EMFC176	0.00	n	EMFC214	2.37	h
EMFC146	0.00	n	EMFC177	0.00	n	EMFC215	7.73	bcde
EMFC147	0.00	n	EMFC178	0.00	n			
EMFC148	0.00	n	EMFC179	0.00	n			
EMFC149	0.00	n	EMFC180	0.00	n			
EMFC150	0.00	n	EMFC181	0.00	n			
EMFC151	3.51	ef	EMFC182	0.00	n			
EMFC152	1.97	ij	EMFC183	4.15	def			
EMFC153	0.00	n	EMFC184	2.42	h			
EMFC154	0.00	n	EMFC185	0.00	n			
EMFC156	1.97	ij	EMFC186	0.00	n			
EMFC157	1.59	klm	EMFC189	0.00	n			
EMFC158	2.65	gh	EMFC191	0.00	n			
EMFC159	0.00	n	EMFC192	0.00	n			
EMFC160	0.00	n	EMFC193	0.00	n			

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 7 mostra os Índices enzimáticos para produção de pectato liase por isolado. Observou-se que os isolados EMFC3, com IE de 11.40 e EMFC92 com IE de 8.46, onde o primeiro foi isolado da rizosfera do genótipo SK x BK-00 e o segundo, da rizosfera do genótipo Citrandarin San Diego 314. Como pior IE, observou-se o isolado EMFC157, com IE de 1.43, o mesmo era endofítico de caule do genótipo Citrandarin Riverside 264.

**Tabela 7.** Índice Enzimático para a produção de pectato liase por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros, cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Isolado	IE médio		Isolado	IE médio		Isolado	IE médio	
	(mm)			(mm)			(mm)	
EMFC1	0.00	r	EMFC41	0.00	r	EMFC85	3.17	fg
EMFC2	0.00	r	EMFC42	2.20	jkl	EMFC86	0.00	r
EMFC3	11.40	a	EMFC43	0.00	r	EMFC87	0.00	r
EMFC5	0.00	r	EMFC44	0.00	r	EMFC88	0.00	r
EMFC6	0.00	r	EMFC45	0.00	r	EMFC90	0.00	r
EMFC7	0.00	r	EMFC47	0.00	r	EMFC91	3.94	de
EMFC8	0.00	r	EMFC48	0.00	r	EMFC92	8.46	a
EMFC9	0.00	r	EMFC49	0.00	r	EMFC93	0.00	r
EMFC10	6.70	ab	EMFC50	0.00	r	EMFC94	0.00	r
EMFC11	2.03	lmn	EMFC51	0.00	r	EMFC95	0.00	r
EMFC12	0.00	r	EMFC52	7.93	a	EMFC96	0.00	r
EMFC13	0.00	r	EMFC53	0.00	r	EMFC97	0.00	r
EMFC14	0.00	r	EMFC55	0.00	r	EMFC98	0.00	r
EMFC15	0.00	r	EMFC56	4.46	de	EMFC99	0.00	r
EMFC16	0.00	r	EMFC57	0.00	r	EMFC100	0.00	r
EMFC17	4.21	de	EMFC58	5.72	ab	EMFC101	0.00	r
EMFC18	0.00	r	EMFC59	0.00	r	EMFC103	3.34	f
EMFC21	0.00	r	EMFC60	1.46	q	EMFC105	0.00	r
EMFC22	0.00	r	EMFC62	0.00	r	EMFC106	0.00	r
EMFC23	0.00	r	EMFC66	4.04	de	EMFC107	0.00	r
EMFC24	5.05	f	EMFC67	5.43	bc	EMFC108	0.00	r
EMFC25	1.61	pq	EMFC68	0.00	r	EMFC109	0.00	r
EMFC26	0.00	r	EMFC69	0.00	r	EMFC110	0.00	r
EMFC27	0.00	r	EMFC70	0.00	r	EMFC111	0.00	r
EMFC28	0.00	r	EMFC71	0.00	r	EMFC112	0.00	r
EMFC30	0.00	r	EMFC72	0.00	r	EMFC114	0.00	r
EMFC31	4.52	cd	EMFC73	0.00	r	EMFC115	0.00	r
EMFC32	0.00	r	EMFC74	0.00	r	EMFC116	0.00	r
EMFC33	0.00	r	EMFC75	0.00	r	EMFC117	0.00	r
EMFC34	4.27	de	EMFC77	0.00	r	EMFC118	0.00	r
EMFC35	0.00	r	EMFC78	0.00	r	EMFC119	2.51	ij
EMFC36	0.00	r	EMFC80	3.17	fg	EMFC120	0.00	r
EMFC37	0.00	r	EMFC82	0.00	r	EMFC122	0.00	r
EMFC38	0.00	r	EMFC83	0.00	r	EMFC123	1.82	nop
EMFC40	0.00	r	EMFC84	0.00	r	EMFC124	0.00	r

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 7. Cont...**

<b>Isolado</b>	<b>IE médio</b>		<b>Isolado</b>	<b>IE médio</b>		<b>Isolado</b>	<b>IE médio</b>	
	(mm)			(mm)			(mm)	
EMFC125	0.00	r	EMFC161	0.00	r	EMFC205	0.00	r
EMFC126	0.00	r	EMFC162	1.48	q	EMFC206	1.62	opq
EMFC127	3.48	f	EMFC163	0.00	r	EMFC207	0.00	r
EMFC128	0.00	r	EMFC164	0.00	r	EMFC208	0.00	r
EMFC129	0.00	r	EMFC165	0.00	r	EMFC209	3.22	fg
EMFC130	2.73	hi	EMFC166	0.00	r	EMFC212	0.00	r
EMFC131	0.00	r	EMFC167	0.00	r	EMFC214	2.53	i
EMFC132	0.00	r	EMFC168	0.00	r	EMFC215	2.88	gh
EMFC133	0.00	r	EMFC169	0.00	r			
EMFC134	2.42	ijk	EMFC170	0.00	r			
EMFC135	0.00	r	EMFC171	0.00	r			
EMFC136	0.00	r	EMFC172	0.00	r			
EMFC137	0.00	r	EMFC174	0.00	r			
EMFC138	2.61	hi	EMFC176	0.00	r			
EMFC139	0.00	r	EMFC177	0.00	r			
EMFC140	0.00	r	EMFC178	0.00	r			
EMFC141	0.00	r	EMFC179	0.00	r			
EMFC142	0.00	r	EMFC180	0.00	r			
EMFC143	0.00	r	EMFC181	0.00	r			
EMFC144	0.00	r	EMFC182	4.06	de			
EMFC145	0.00	r	EMFC183	2.37	ijk			
EMFC146	0.00	r	EMFC184	2.14	klm			
EMFC147	1.90	mno	EMFC185	0.00	r			
EMFC148	0.00	r	EMFC186	0.00	r			
EMFC149	0.00	r	EMFC189	0.00	r			
EMFC150	0.00	r	EMFC191	0.00	r			
EMFC151	1.92	lmn	EMFC192	0.00	r			
EMFC152	0.00	r	EMFC193	0.00	r			
EMFC153	0.00	r	EMFC194	0.00	r			
EMFC154	0.00	r	EMFC197	0.00	r			
EMFC156	0.00	r	EMFC199	0.00	r			
EMFC157	1.43	q	EMFC200	0.00	r			
EMFC158	0.00	r	EMFC202	3.93	e			
EMFC159	0.00	r	EMFC203	3.96	e			
EMFC160	0.00	r	EMFC204	0.00	r			

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

As pectinases, aqui representadas como pectato liase e poligalacturonase são também umas das muitas enzimas extracelulares produzidas pelas bactérias.

No presente trabalho podemos observar que a produção das duas enzimas juntas não está implícita e nem são diretamente proporcionais. Todos os nichos apresentaram a produção das enzimas, no entanto em diferentes proporções para o IE.

Para a pectato liase, o nicho solo apresentou o IE maior, seguido do nicho raiz. Esta enzima atua em pH mais alcalino, entretanto, o sistema radicular e o solo ao redor pode, que pode ser mais acidificado pela liberação de prótons (H<sup>+</sup>) resultantes do metabolismo vegetal, não impediu o funcionamento da enzima. Já a poligalacturonase para o mesmo nicho, mesmo apresentando valores de IE altos, ainda foram mais baixos que os da primeira enzima. Assim como para as outras enzimas, percebeu-se que o hospedeiro afeta diretamente a produção de pectinases. Isso pode ocorrer pelo fato de cada organismo, ou combinação (no caso deste trabalho) se comporta de forma diferente frente as imposições do meio em que habita.

Diversos grupos de micro-organismos apresentam a capacidade de produzir substâncias pécticas, incluindo as bactérias. Assim como as enzimas celulasas, as pectinases podem auxiliar na penetração das bactérias na planta hospedeira e auxiliar na indução de resistência sistêmica (Hallmann et al., 1997; Uenojo e Pastore 2007; Szilagyi-Zecchin et al., 2014)

O trabalho realizado por Uenojo e Pastore (2006) resultou em isolados bacterianos de diferentes partes da planta e de diferentes plantas, como como frutas, grãos de café, entre outros. Os autores encontraram 104 isolados e destes, apenas 18 foram positivos para a produção de pectinases, enquanto que neste trabalho, encontrou-se a média de 36 isolados. Já Carrim et al. (2006), não encontrou isolado positivo para pectinases, em ensaio realizado com isolados de *Jacaranda decurrens* Cham.

Asraful et al. (2010) também encontraram isolados positivos para a produção de pectinases, habitando endofiticamente raízes de plantas de *Platycodon grandiflorum*, com isolados produzindo halos maiores que 6mm para ambas as enzimas. Já Hung e Annapurna (2004) afirmam que 33% dos 65 linhagens bacterianas isoladas de plantas de soja (*Glicine max* e *G. soja*) foram capazes de produzir pectinases e 70 % de produzir celulase, diferente dos

isolados testados no presente trabalho, onde apenas aproximadamente 20 % foram positivos para a produção de pectinases.

Diversos trabalhos com o de Berg et al. (2005), com isolados endofíticos originados de raízes de batata, e o de Li et al.(2010), com isolados endofíticos oriundos raízes de algodão associam a atividade pectinolítica à atividade antagonística a fungos. Colaborando com a afirmação de que bactérias que apresentam a capacidade de produzir enzimas extracelulares podem auxiliar na indução da resistência sistêmica do hospedeiro.

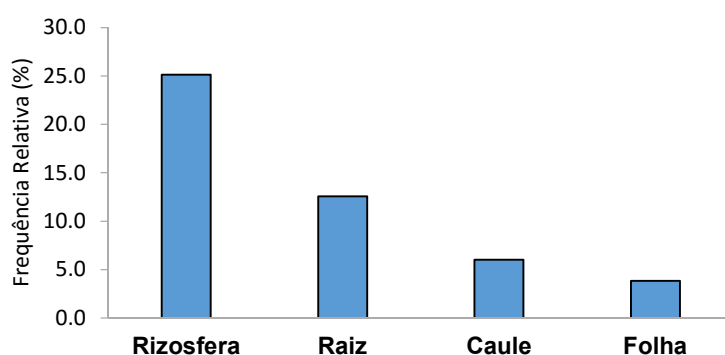
#### 4.3 Produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas

##### **Solubilização de fosfato inorgânico**

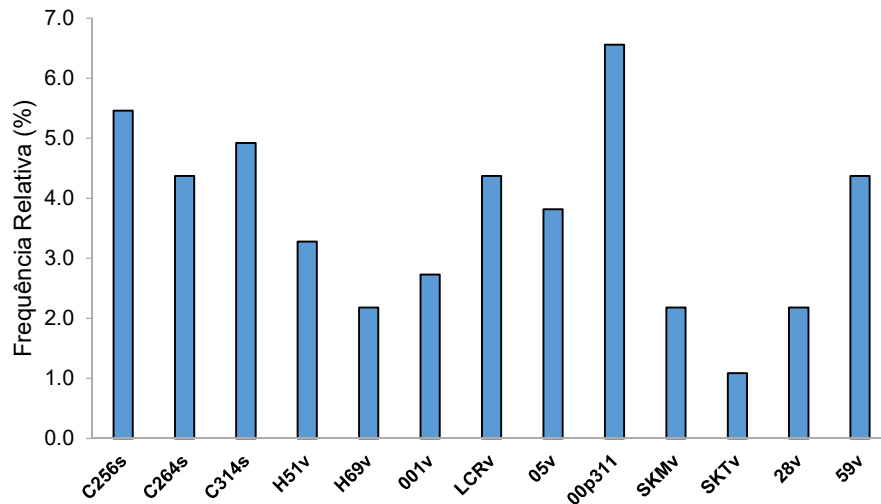
Dos 183 isolados avaliados, aproximadamente 48% foram positivos para a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. A distribuição das bactérias produtoras de fosfatases foi diferente entre os nichos e entre os genótipos estudados, de acordo com o teste de  $\chi^2$ .

Avaliando a Figura 15, nota-se que a rizosfera mostrou 25.14% das bactérias positivas para a solubilização de fosfato, enquanto que o nicho folha, apresentou apenas 3.83% dos isolados positivos.

Já em relação aos genótipos (Figura 16), o genótipo SK x BK -00 apresentou uma maior frequência em relação aos outros genótipos, com 6.56% dos isolados positivos, seguido do Citrandarin Índio 256, com 5.46%. Enquanto que o genótipo Sunki tropical representou apenas 1.09%.



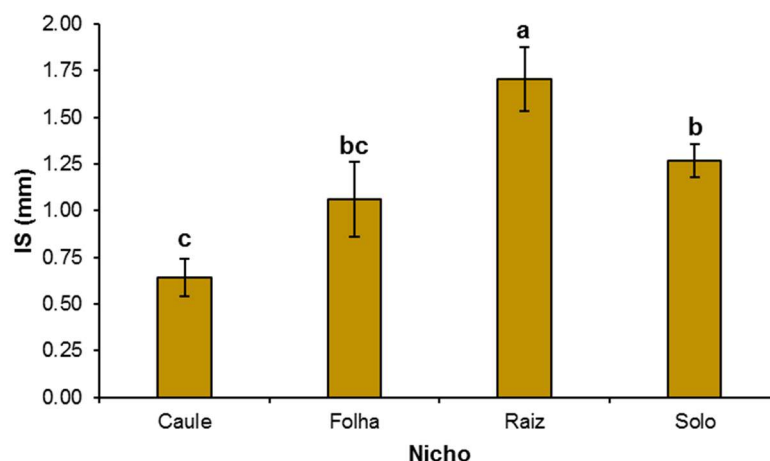
**Figura 15.** Distribuição das linhagens bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16.** Distribuição das linhagens bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico em relação ao genótipo do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos genótipos ( $p < 0,05$ ).

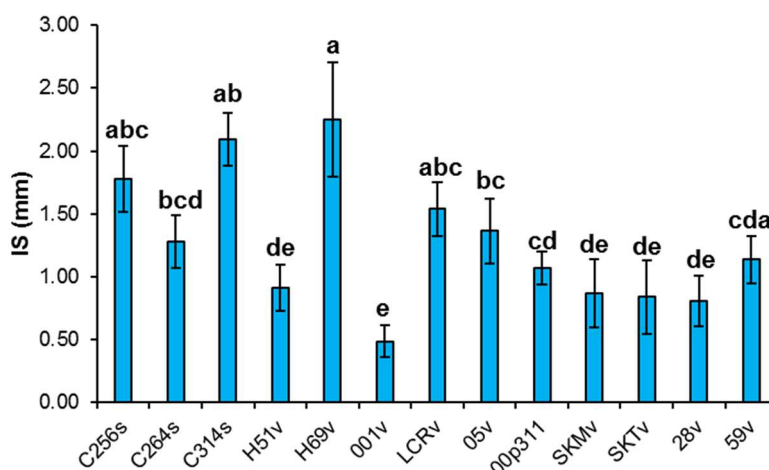
Para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, foi calculado o Índice de Solubilização (IS), que é calculado da mesma forma do Índice Enzimático. E assim como o IE, bactérias que apresentam um IS acima de 2 são consideradas boas solubilizadoras. Os índices de solubilização foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e mostraram que houve influência tanto do nicho de isolamento e da combinação genótipo e porta-enxerto na produção de fosfatase ( $p > 0,05$ ).

A Figura 17 mostra nos IS médios baseados no nicho de isolamento. O teste de Kruskal-Wallis confirma que houve a influência dos nichos estudados no IS (Kruskal-Wallis:  $X^2 = 26,8589$ ;  $gl = 3$ ,  $p\text{-valor} = 9,151e^{-06}$ ), confirmando pelo teste de Wilcoxon. Observa-se que os isolados oriundos da raiz foram os que apresentaram o maior IS, com IS médio de 1,70 mm. Seguido do nicho solo, onde os isolados apresentaram um IS médio de 1,27 mm. No nicho caule, os isolados apresentaram os índices mais baixos, com média de 0,64 mm.



**Figura 17.** Índice de Solubilização de fósforo (mm) produzido em relação ao nicho de isolamento. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

A média dos IS da combinação genótipo e porta-enxerto pode ser observado na Figura 18. Nota-se que a combinação HTR-069 sobre Volkameriano se destacou ante as demais combinações, com IS médio de 2,25 mm. Seguidos da combinação Citrandarin San Diego 314 sobre Swingle, com IS médio de 2,1. O pior IS foi apresentado pela combinação LCRxTR-001 sobre Volkameriano, com IS de 0,5.



**Figura 18.** Índice de Solubilização de fósforo (mm) produzido em relação as combinações genótipo e porta-enxerto. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência das combinações ( $p < 0,05$ ).

O IS por isolado pode ser observado na Tabela 8. Observou-se que os isolados EMFC192 e EMCF206 destacaram-se, com IS de 6,49 e 6,0, respectivamente. Os mesmos foram isolados de raízes dos genótipos Citrandarin Índio 256 e Sunki Maravilha. Já os isolados EMFC135 e EMFC140, com IS abaixo de 1,25, ficando abaixo do índice considerado ideal. Os mesmos foram isolados de caules dos genótipos SK x BK - 00 e LCR x TR - 001, respectivamente.

**Tabela 8.** Média dos Índices de Solubilização para a solubilização de fosfato inorgânico por isolados bacterianos da rizosfera e endofíticas de raízes, caules e folhas de 13 combinações de genótipos e porta-enxerto de citros, cultivadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Isolado	IE médio		Isolado	IE médio		Isolado	IE médio	
	(mm)			(mm)			(mm)	
EMFC1	0.00	J	EMFC42	4.57	abc	EMFC87	1.53	CDEFGHI
EMFC2	0.00	J	EMFC43	0.00	J	EMFC88	0.00	J
EMFC3	0.00	J	EMFC44	3.55	bcdefg	EMFC90	2.97	ghijk
EMFC5	0.00	J	EMFC45	0.00	J	EMFC91	0.00	J
EMFC6	2.01	rstuvwx	EMFC47	0.00	J	EMFC92	3.13	efghij
EMFC7	0.00	J	EMFC48	0.00	J	EMFC93	2.21	nopqrs
EMFC8	0.00	J	EMFC49	1.85	tuvwxyzA	EMFC94	1.78	vwxyzABC
EMFC9	0.00	J	EMFC50	0.00	J	EMFC95	1.77	wxyzABCD
EMFC10	1.50	EFGHI	EMFC51	1.34	HI	EMFC96	0.00	J
EMFC11	0.00	J	EMFC52	2.95	ghijk	EMFC97	0.00	J
EMFC12	3.42	cdefgh	EMFC53	1.68	zABCDEF	EMFC98	0.00	J
EMFC13	2.73	ijklm	EMFC55	0.00	J	EMFC99	0.00	J
EMFC14	3.84	abcd	EMFC56	0.00	J	EMFC100	1.61	BCDEFGH
EMFC15	1.97	qrstuvwx	EMFC57	2.61	mnopq	EMFC101	0.00	J
EMFC16	0.00	J	EMFC58	0.00	J	EMFC103	2.10	opqrst
EMFC17	0.00	J	EMFC59	0.00	J	EMFC105	2.45	klmno
EMFC18	0.00	J	EMFC60	0.00	J	EMFC106	1.74	yzABCDEf
EMFC21	0.00	J	EMFC62	2.87	hijkl	EMFC107	0.00	J
EMFC22	3.75	abcdef	EMFC66	1.98	stuvwxy	EMFC108	2.23	qrstuvw
EMFC23	2.90	ghijkl	EMFC67	0.00	J	EMFC109	2.58	jklmn
EMFC24	0.00	J	EMFC68	0.00	J	EMFC110	0.00	J
EMFC25	0.00	J	EMFC69	3.44	cdefgh	EMFC111	0.00	J
EMFC26	0.00	J	EMFC70	2.45	klmno	EMFC112	0.00	J
EMFC27	0.00	J	EMFC71	0.00	J	EMFC114	0.00	J
EMFC28	0.00	J	EMFC72	0.00	J	EMFC115	0.00	J
EMFC30	1.38	GHI	EMFC73	2.06	pqrstuv	EMFC116	0.00	J
EMFC31	3.43	cdefgh	EMFC74	4.58	abc	EMFC117	1.76	wxyzABCD
EMFC32	0.00	J	EMFC75	4.50	abc	EMFC118	0.00	J
EMFC33	0.00	J	EMFC77	0.00	J	EMFC119	0.00	J
EMFC34	0.00	J	EMFC78	2.08	pqrstu	EMFC120	0.00	J
EMFC35	0.00	J	EMFC80	1.91	stuvwxyz	EMFC122	2.23	opqrst
EMFC36	3.93	abcde	EMFC82	3.02	ghijk	EMFC123	1.49	FGHI
EMFC37	0.00	J	EMFC83	1.83	vwxyzAB	EMFC124	3.10	defghij
EMFC38	1.66	ABCDEFGH	EMFC84	2.72	ijklm	EMFC125	0.00	J
EMFC40	0.00	J	EMFC85	2.44	lmnop	EMFC126	0.00	J
EMFC41	2.81	hijkl	EMFC86	2.00	rstuvwx	EMFC127	0.00	J

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8. Cont...**

Isolado	IE médio		Isolado	IE médio		Isolado	IE médio	
	(mm)			(mm)			(mm)	
EMFC128	3.56	cdefghi	EMFC165	0.00	J	EMFC212	1.91	stuvwxyz
EMFC129	3.65	bcdefg	EMFC166	0.00	J	EMFC214	2.02	qrstuvw
EMFC130	3.35	defghi	EMFC167	1.71	wxyzABCD	EMFC215	3.85	abcde
EMFC131	0.00	J	EMFC168	1.72	xyzABCDE			
EMFC132	3.10	efghij	EMFC169	1.56	DEFGHI			
EMFC133	1.96	qrstuvw	EMFC170	2.05	pqrstu			
EMFC134	0.00	J	EMFC171	1.93	stuvwxy			
EMFC135	1.21	I	EMFC172	1.80	uvwxyzAB			
EMFC136	0.00	J	EMFC174	3.09	ijklm			
EMFC137	0.00	J	EMFC176	0.00	J			
EMFC138	0.00	J	EMFC177	5.51	ab			
EMFC139	0.00	J	EMFC178	0.00	J			
EMFC140	1.23	I	EMFC179	0.00	J			
EMFC141	0.00	J	EMFC180	0.00	J			
EMFC142	0.00	J	EMFC181	1.58	BCDEFGH			
EMFC143	0.00	J	EMFC182	1.54	CDEFGHI			
EMFC144	0.00	J	EMFC183	2.07	qrstuv			
EMFC145	0.00	J	EMFC184	2.07	qrstuv			
EMFC146	1.76	wxyzABCD	EMFC185	1.77	wxyzABCD			
EMFC147	3.04	ghijk	EMFC186	0.00	J			
EMFC148	0.00	J	EMFC189	0.00	J			
EMFC149	0.00	J	EMFC191	0.00	J			
EMFC150	0.00	J	EMFC192	6.49	a			
EMFC151	0.00	J	EMFC193	3.58	cdefghi			
EMFC152	0.00	J	EMFC194	0.00	J			
EMFC153	1.94	stuvwxy	EMFC197	2.38	mnpq			
EMFC154	0.00	J	EMFC199	2.02	qrstuvw			
EMFC156	0.00	J	EMFC200	1.60	BCDEFGH			
EMFC157	3.04	fghij	EMFC202	0.00	J			
EMFC158	0.00	J	EMFC203	2.94	ghijk			
EMFC159	1.43	FGHI	EMFC204	0.00	J			
EMFC160	0.00	J	EMFC205	0.00	J			
EMFC161	0.00	J	EMFC206	6.00	a			
EMFC162	0.00	J	EMFC207	0.00	J			
EMFC163	0.00	J	EMFC208	1.89	stuvwxyz			
EMFC164	2.63	jklmn	EMFC209	0.00	J			

Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

A solubilização de fosfato inorgânico é considerada uma forma de promoção de crescimento de plantas por disponibilizar e facilitar a aquisição deste nutriente pelo hospedeiro. No presente trabalho, observou-se que bactérias isoladas da raiz e do solo apresentaram maior IS, enquanto que as



originadas do caule apresentaram o menor IS. Esperava-se que o maior IS fosse encontrado nas bactérias rizosféricas. No trabalho realizado por Taurian et al. (2010), os autores também encontraram maiores IS em bactérias oriundas das raízes do que das outras partes da planta, confirmando os dados encontrados.

O trabalho de Tironi et al. (2009), mostrou que os autores encontraram o IS máximo de 3,42 para isolados do solo rizosférico de cana-de-açúcar, diferente do encontrado neste trabalho diferindo do encontrado, que variou de 1.2 a 6.5, e a maioria dos isolados apresentou índice acima de 2.0.

O hospedeiro também influenciou o IS e a frequência bacteriana. Observa-se que as combinações com o porta-enxerto Volkameriano e Swingle tiveram destaque no IS, enquanto que, na frequência de bactérias solubilizadoras o porta-enxerto 311 se destacou, no entanto, o IS médio foi de 1,5, contra 2,3 do Volkameriano. A combinação entre o enxerto e o porta-enxerto pode ter afetado a população.

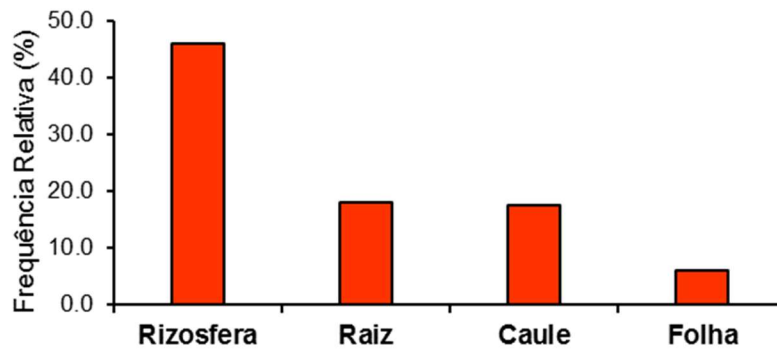
Andrade et al.(2014) também avaliaram a produção de substâncias promotoras de crescimento em 40 isolados endofíticos de raízes de bananeira “Prata Anã”. Dos isolados avaliados, 37% apresentaram capacidade para solubilizar fosfato, enquanto que neste trabalho observou-se 48% dos isolados, e com mais da metade destes considerados bons solubilizadores.

O trabalho realizado por Dias et al. (2008) ilustra bem a diferença da frequência de isolados positivos para a solubilização de P em relação ao hospedeiro e também como isso afeta a solubilização de P.

### **Produção de AIA**

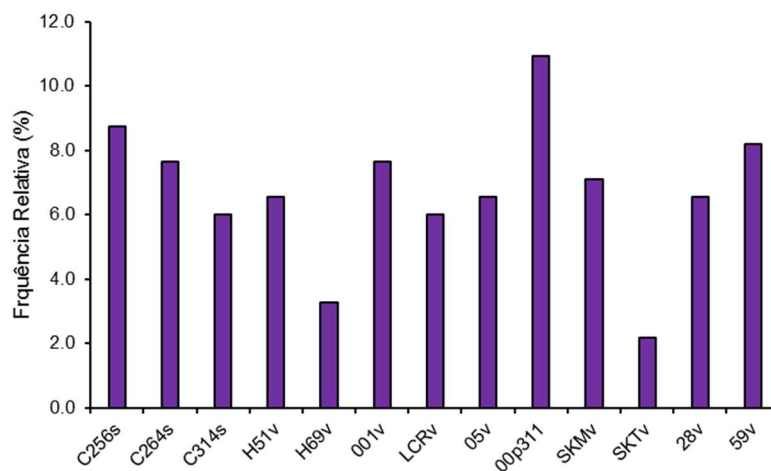
Quanto a produção de AIA, dos 183 isolados avaliados, cerca de 160 isolados apresentaram a capacidade de produzir ácido indol acético (AIA) via dependente de L- triptofano, o que equivale a 86.89% das linhagens bacterianas avaliadas.

Quanto ao nicho (Figura 19), a rizosfera respondeu com 45.9% das linhagens positivas para a produção de AIA. Os nichos caule e raiz apresentaram valores semelhantes, com 18.03% e 17.49%, respectivamente, e mesmo com valores semelhantes, apresentaram diferença estatística segundo o teste do  $\chi^2$  ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de ácido indol acético dependente de L-triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

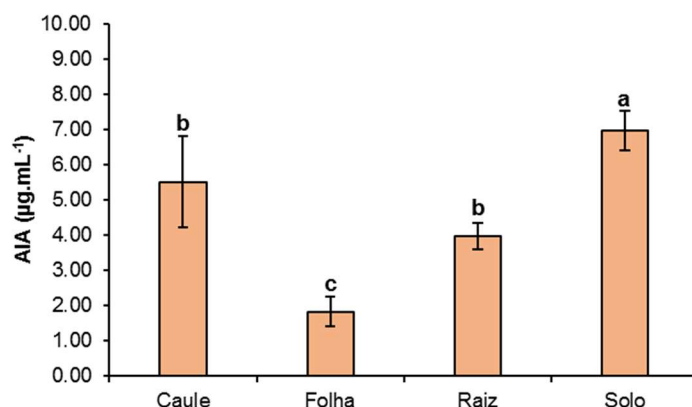
Já em relação ao genótipo (Figura 20), SK x BK – 00 destacou-se com 10.93% das linhagens positivas. Seguido dos genótipos TSKCX x (TR x LCR) 059, com 8.19% e dos Citrandarin Riverside 264 e LCR x TR – 001, ambos com 7.65% cada. O genótipo menos representativo foi o Sunki Tropical, apresentando 2.18% do isolados.



**Figura 20.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de ácido indol acético dependente de L-triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos genótipos ( $p < 0,05$ ).

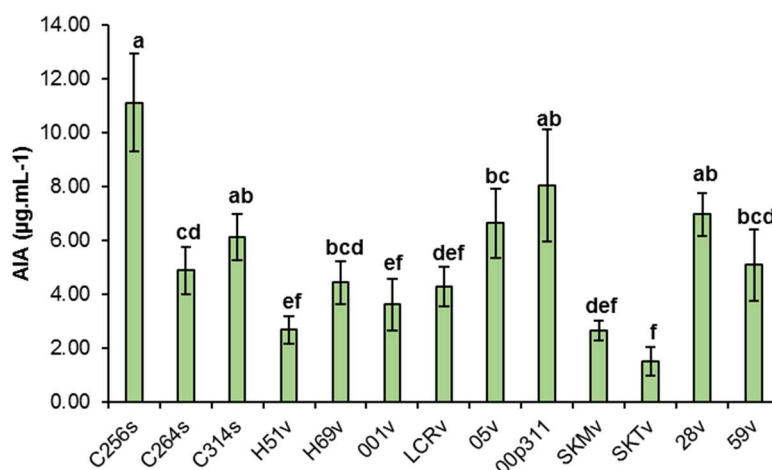
Com relação a quantidade de AIA produzido, notou-se que os nichos rizosfera e caule mostraram maiores quantidades médias de AIA produzido, com

6.9  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  e 5.51  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  (Figura 21). Folha mostrou-se o nicho com menor quantidade produzida (1.83  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ).



**Figura 21.** Influência do nicho de colonização bacteriana sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao genótipo influenciando a produção de AIA, observou-se que o genótipo Citrandarin Índio 256 destacou-se em relação aos demais, com produção média de 11.12  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Como genótipo que menos se destacou, o Sunki Tropical, com produção de AIA médio de 1.5  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  (Figura 22).



**Figura 22.** Influência da combinação genótipo e porta-enxerto sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si. A análise pelos testes de Kruskal-Wallis e Wilcoxon mostraram que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

A produção por isolado teve grande variação (Tabela 9), com grande destaque para o isolado EMFC132, com produção de 82.32  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , seguido do isolado EMFC78, com produção de 49.36  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A produção de AIA teve grande variação, observou-se que aproximadamente 82% dos isolados se encontram na faixa de produção que vai até 10.16  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , e dentre estas, cerca de 65% com produções de até 5.9  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

**Tabela 9.** Média da Quantificação da produção ácido indol acético via dependente de triptofano por bactérias isoladas da rizosfera, e endofíticas de raiz, caule de folha de 13 genótipos híbridos de porta enxerto de citros, cultivados na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Isolado	AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Isolado	AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Isolado	AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Isolado	AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
EMFC118	0.15a1	EMFC31	1.31a1	EMFC48	4.29a2	EMFC179	8.15a3
EMFC11	0.16a1	EMFC126	1.56a1	EMFC154	4.31a2	EMFC18	8.17a3
EMFC97	0.29a1	EMFC37	1.56a1	EMFC114	4.34a2	EMFC150	8.29a3
EMFC189	0.29a1	EMFC59	1.64a1	EMFC47	4.37a2	EMFC75	8.3a3
EMFC185	0.29a1	EMFC147	1.72a1	EMFC14	4.38a2	EMFC170	8.37a3
EMFC205	0.3a1	EMFC169	1.73a1	EMFC45	4.4a2	EMFC199	8.51a3
EMFC139	0.3a1	EMFC203	1.8a1	EMFC159	4.41a2	EMFC192	9.16a3
EMFC178	0.37a1	EMFC130	1.81a1	EMFC135	4.49a2	EMFC157	9.21a3
EMFC138	0.37a1	EMFC128	1.89a1	EMFC66	4.59a2	EMFC35	9.25a3
EMFC161	0.41a1	EMFC100	1.99a1	EMFC140	4.73a2	EMFC133	9.38a3
EMFC171	0.45a1	EMFC42	1.99a1	EMFC206	4.78a2	EMFC84	9.49a3
EMFC98	0.51a1	EMFC184	2.03a1	EMFC86	4.81a2	EMFC106	9.61a3
EMFC162	0.56a1	EMFC125	2.04a1	EMFC13	4.85a2	EMFC51	10.16a3
EMFC91	0.6a1	EMFC70	2.09a1	EMFC12	5.08a2	EMFC197	10.87a4
EMFC73	0.63a1	EMFC168	2.12a1	EMFC3	5.13a2	EMFC105	11.23a4
EMFC50	0.64a1	EMFC34	2.15a1	EMFC194	5.13a2	EMFC87	11.46a4
EMFC167	0.65a1	EMFC109	2.2a1	EMFC160	5.17a2	EMFC83	11.78a4
EMFC110	0.66a1	EMFC141	2.22a1	EMFC49	5.19a2	EMFC215	11.82a4
EMFC186	0.67a1	EMFC96	2.22a1	EMFC176	5.22a2	EMFC146	12.25a4
EMFC112	0.7a1	EMFC119	2.41a1	EMFC142	5.45a2	EMFC62	12.31a4
EMFC103	0.71a1	EMFC182	2.55a2	EMFC137	5.49a2	EMFC32	12.42a4
EMFC117	0.73a1	EMFC40	2.7a2	EMFC27	5.5a2	EMFC124	12.75a4
EMFC200	0.73a1	EMFC17	2.75a2	EMFC144	5.5a2	EMFC43	13.12a4
EMFC158	0.75a1	EMFC16	2.89a2	EMFC56	5.66a2	EMFC177	13.44a4
EMFC99	0.78a1	EMFC212	2.97a2	EMFC153	5.74a2	EMFC94	13.68a4
EMFC131	0.8a1	EMFC68	3.03a2	EMFC23	5.91a2	EMFC80	13.81a4
EMFC127	0.82a1	EMFC60	3.08a2	EMFC202	6.18a3	EMFC82	13.92a4
EMFC166	0.87a1	EMFC172	3.26a2	EMFC44	6.24a3	EMFC21	14.01a4
EMFC148	0.87a1	EMFC207	3.28a2	EMFC30	6.37a3	EMFC85	15.2a5
EMFC36	0.97a1	EMFC25	3.29a2	EMFC174	6.53a3	EMFC52	15.45a5
EMFC151	1.01a1	EMFC6	3.33a2	EMFC145	6.68a3	EMFC38	16.84a5
EMFC72	1.04a1	EMFC92	3.35a2	EMFC1	6.8a3	EMFC88	19.14a5
EMFC183	1.05a1	EMFC107	3.54a2	EMFC71	6.84a3	EMFC55	25.82a6
EMFC164	1.07a1	EMFC95	3.56a2	EMFC193	6.88a3	EMFC57	29.14a6
EMFC149	1.1a1	EMFC24	3.6a2	EMFC134	6.97a3	EMFC53	31.93a7
EMFC93	1.17a1	EMFC28	3.77a2	EMFC90	7.28a3	EMFC69	35.2a8
EMFC191	1.18a1	EMFC129	3.8a2	EMFC22	7.29a3	EMFC26	36.99a8
EMFC15	1.23a1	EMFC209	3.89a2	EMFC8	7.34a3	EMFC78	49.36a9
EMFC156	1.26a1	EMFC10	4.13a2	EMFC208	7.76a3	EMFC132	82.32a10
EMFC181	1.29a1	EMFC136	4.24a2	EMFC74	8.07a3		

Letras iguais seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Média de três repetições.

As produções de substâncias promotoras do crescimento de plantas foram identificadas em grande parte dos isolados avaliados, além disso, foi visível a influência tanto do genótipo quanto do hospedeiro para todas as variáveis analisadas.

Patten e Glick (1996) afirmam que em torno de 80% das bactérias rizosféricas apresentam a capacidade de produzir AIA, conforme confirmado neste trabalho. Apesar de nem todas serem da rizosfera, podemos afirmar a maioria dos isolados estudados, associados a diferentes nichos de híbridos de citros tem capacidade para sintetizar AIA, seja em maior ou menor quantidade.

Diante dos resultados, nota-se que a resposta alta da rizosfera para a produção de AIA deve-se a presença de L-triptofano, como uma das substâncias presentes nos exsudados radiculares. Kravchenko et al. (2004) afirmam que o triptofano excretado pelas raízes pode influenciar na regulação da síntese de auxinas pelas bactérias da rizosfera, onde estas aumentam a quantidade de auxina tanto quanto grande for a quantidade de triptofano disponibilizada.

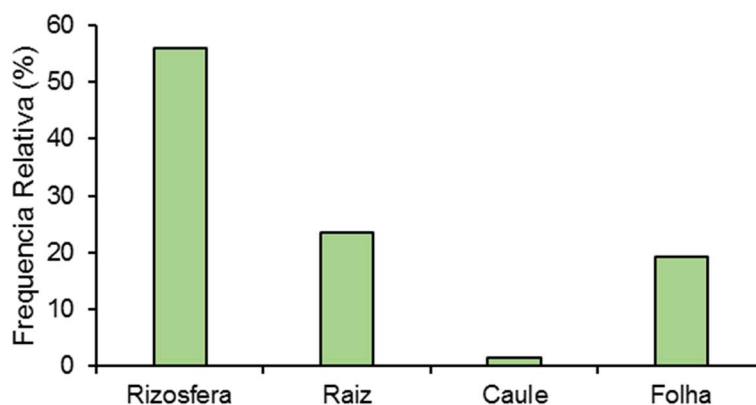
Andrade et al.(2014) também avaliaram a produção de substancias promotoras de crescimento em 40 isolados endofíticos de raízes de bananeira “Prata Anã”. Para a produção de AIA, encontraram um máximo de 47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , diferindo dos 82  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  encontrados.

É preciso ressalvas quanto a alta produção de AIA. Isolados que apresentam altas produções do mesmo podem vir a inibir o crescimento de plantas, como no ensaio realizado por Long et al. (2008), onde os autores observaram a inibição no desenvolvimento de raízes de plântulas de *Solanum nigrum* quando inoculadas com isolados que produziram de 90 a 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$

### **Fixação Biológica de Nitrogênio**

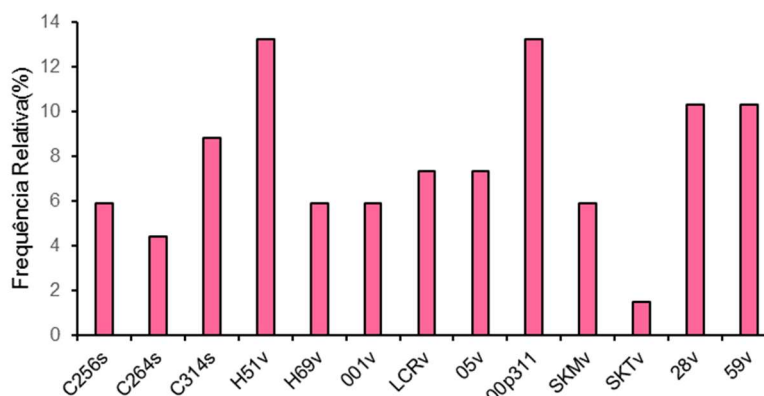
O potencial de fixação biológica de nitrogênio foi avaliado utilizando 4 tipos diferentes de meio de cultura semissólido livre da fonte nitrogenada, cujos foram: JMV, NFB, LGI-P e JNFb. Nestes, foi observada a capacidade de formação da película específica, que indica a potencial fixação de nitrogênio. Dos 183 isolados avaliados, 68 mostraram a película específica, em um ou mais meios de cultura, representando 37,16% dos isolados.

Dos isolados positivos, cerca de 55.88 % pertencem a rizosfera, seguido 23.53% endofíticas de raiz. O nicho folha respondeu com apenas 1.47% dos isolados (Figura 23).



**Figura 23.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com o nicho de colonização sobre a potencial fixação biológica de nitrogênio atmosférico. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

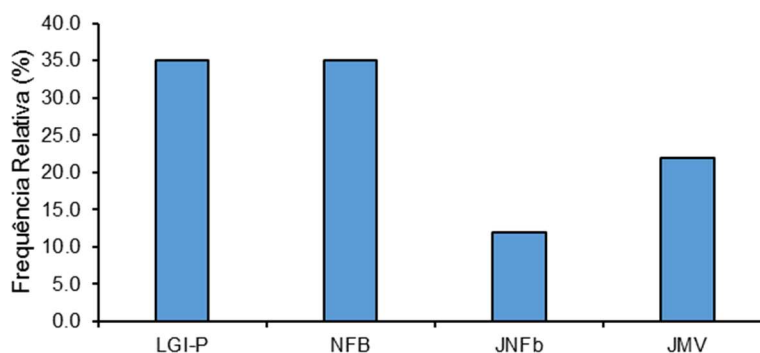
A figura 24 mostra a frequência de bactérias positivas em relação ao genótipo, mostrando que os genótipos HTR-69 e o SK x BK-00 foram os que mostraram maiores frequências de bactérias positivas.



**Figura 24.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com o genótipo do hospedeiro sobre a potencial fixação biológica de nitrogênio atmosférico. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

Com relação ao crescimento dos nos quatro diferentes meios de cultura (Figura 25), cerca de 51,47% dos isolados testados se mostraram positivos nos

meios NFB e LGI-P, e aproximadamente 32% no meio JMV. Os isolados inoculados no JNFb tiveram uma menor frequência de positivas.



**Figura 25.** Distribuição das linhagens bacterianas positivas para a fixação biológica de nitrogênio, de acordo com o meio de cultura.

A tabela 10 mostra os isolados que foram positivos para cada meio de cultura testado. Notou-se que apenas 3 isolados conseguiram mostrar a película indicadora da fixação nos 4 meios, o EMFC177, EMFC192 e EMFC215. E 4 isolados foram positivos para 3 meios, o EMFC75, EMFC145, EMFC184 e EMFC206, todos para os meios NFB, LGI-P e JMV. Aproximadamente 70% dos isolados positivos só apresentaram a película de fixação em um tipo de meio.

A frequência relativa de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio no nicho solo reflete a maior disponibilidade de fontes de N disponíveis para a imobilização e posterior mobilização, como restos culturais. Além disso, o solo é mais rico em Fe, Mo e V, cofatores do funcionamento da nitrogenase, a presença em maior quantidade destes pode estimular seu funcionamento (Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Trivedi et al., 2011).

A fixação biológica de nitrogênio *in vitro* é geralmente caracterizada pela formação da película indicadora em meio semissólido livre de nitrogênio. Foram utilizados meios de cultura JMV, NFB, JNFb e LGI-P, que, inicialmente seriam considerados seletivos ou semi seletivos para o desenvolvimento de bactérias diazotróficas específicas, como o JNFb seria específico para *Herbaspirillum spp.*; o NFB para *Azospirillum spp.*, o LGI-P para *Gluconacetobacter sp* e o JMV para *Burkholderia brasilensis* (Döbereiner et al., 1999). Já Videira et al. (2007) mostrou que os mesmo gêneros bacterianos citados podem ser desenvolver em mais de um meio.



**Tabela 10.** Distribuição dos isolados positivos para formação da película de indicação de fixação de nitrogênio, cultivadas em quatro tipos de meio de cultura semissólido livre de nitrogênio

Isolado	NFB	LGI-P	JNFb	JMV	Isolado	NFB	LGI-P	JNFb	JMV
EMFC02	-	-	-	+	EMFC95	-	-	-	+
EMFC05	-	+	-	-	EMFC103	-	-	-	+
EMFC06	-	+	-	-	EMFC106	+	-	-	-
EMFC09	-	-	+	+	EMFC108	-	+	-	-
EMFC11	-	-	+	+	EMFC124	+	-	+	-
EMFC12	-	-	-	+	EMFC132	+	-	-	-
EMFC13	-	+	-	+	EMFC134	-	+	-	-
EMFC14	-	+	-	+	EMFC135	-	+	-	-
EMFC15	-	-	-	+	EMFC136	+	-	-	-
EMFC18	+	-	-	-	EMFC144	-	+	-	-
EMFC21	+	+	-	-	EMFC145	-	+	-	-
EMFC22	-	+	+	-	EMFC146	-	+	+	-
EMFC23	-	+	-	-	EMFC147*	+	+	-	+
EMFC27	-	+	-	-	EMFC148	+	-	-	-
EMFC32	-	-	-	+	EMFC150	-	+	-	-
EMFC34	+	-	-	-	EMFC151	-	+	-	-
EMFC35	+	-	-	-	EMFC154	+	-	-	-
EMFC36	+	+	-	-	EMFC157	-	+	-	+
EMFC38	-	+	-	-	EMFC172	+	-	-	-
EMFC42	+	-	-	-	EMFC174	+	-	-	-
EMFC43	+	-	+	-	EMFC177**	+	+	+	+
EMFC44	+	-	-	-	EMFC178	+	-	-	-
EMFC47	+	+	-	-	EMFC181	+	-	-	-
EMFC48	+	-	-	-	EMFC182	+	-	-	-
EMFC49	+	-	-	-	EMFC183	-	+	-	+
EMFC53	+	-	-	-	EMFC184*	+	+	-	+
EMFC66	-	+	-	-	EMFC192**	+	+	+	+
EMFC69	-	-	+	+	EMFC197	+	-	+	-
EMFC71	+	-	-	-	EMFC199	+	-	-	-
EMFC74	-	+	-	+	EMFC200	-	+	-	-
EMFC75*	+	+	-	+	EMFC206*	+	+	-	+
EMFC82	+	-	-	-	EMFC207	-	+	+	-
EMFC87	-	+	-	-	EMFC208	+	+	-	-
EMFC93	-	+	-	-	EMFC215**	+	+	+	+

\* Isolados positivos para 3 meios (NFB, LGI-P e JMV);

\*\*Isolados positivos para os 4 meios estudados (NFB, LGI-P, JNFb e JMV).

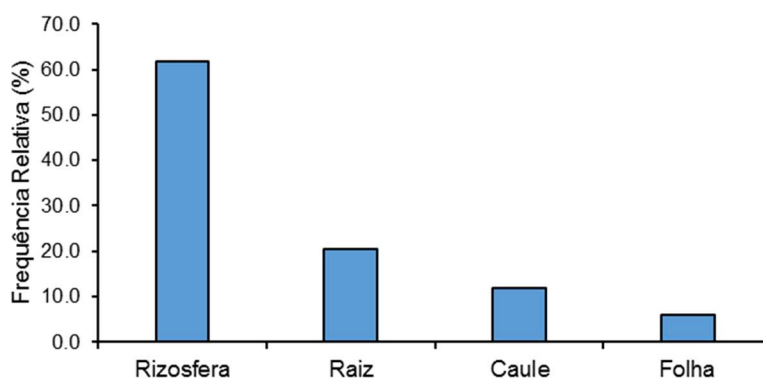
No presente trabalho, tivemos isolados capazes de se desenvolver e mostrar a película fixadora nos 4 tipos diferentes de meios. Kuklinsky-Sobral et al. (2004) avaliaram a possível capacidade de fixação de nitrogênio por bactérias endofíticas de soja, os autores observaram que 60% dos isolados avaliados foram capazes de mostrar a película indicadora em meio NFB, enquanto que no presente trabalho, apenas 51,7% dos isolados apresentaram esta capacidade.

Trivedi et al. (2011) estudou 33 isolados de raízes de *Citrus* sp, cultivar “Valência”. Dos 33 isolados avaliados, apenas 1 não mostrou potencial

capacidade para a fixação de N, em meio BAZ semissólido. Enquanto que no presente trabalho, apenas 68 foram positivos.

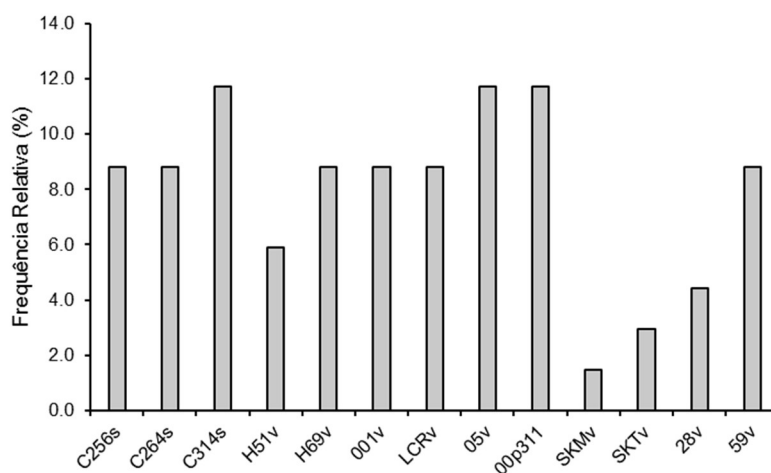
### Produção de Sideróforos

Com relação a produção de sideróforos, dos 183 isolados avaliados, 68 isolados foram positivos, mostrando o halo de coloração amarelo alaranjado ao redor da colônia, o que representa 37,16% das linhagens avaliadas. A rizosfera mais uma vez foi responsável por aproximadamente 60% das linhagens positivas, seguido por raiz (Figura 26).



**Figura 26.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com o nicho de colonização sobre a produção de sideróforos. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).

A Figura 27 mostra a influência dos genótipos sobre as linhagens positivas. Percebemos que os genótipos Citrandarin San Diego 314, LRF x (LCR x TR) 005, SK x BK – 00 mostraram as maiores frequências, com valores de 11.74% das bactérias positivas. Os genótipos Sunki Tropical e Sunki Maravilha foram os que apresentaram as menores frequências, contribuindo com 1.47% e 2.94 % respectivamente.



**Figura 27.** Distribuição das linhagens bacterianas de acordo com genótipo hospedeiro sobre a produção de sideróforos. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos genótipos ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 9 mostra quais isolados foram positivos ou negativos em relação a produção de sideróforos.

Observa-se que mais uma vez a rizosfera se sobressai com relação aos outros nichos, devido a maior disponibilidade de nutrientes orgânicos e minerais neste nicho, decrescendo em direção ao nicho folha. Trabalhos como o de Beneduzi et al. (2008), mostrou que apenas 15% dos 311 isolados foram positivos para a produção de sideróforos, enquanto que no presente trabalho, encontrou-se aproximadamente 38%.

O tipo de solo pode influenciar a comunidade bacteriana, incluindo os produtores de sideróforos. Solos ricos em Fe, podem influenciar a produção de sideróforos para aumentar a disponibilização deste para as bactérias e consequentemente para as plantas.

A produção de sideróforos pelas está associada a capacidade de disponibilização de nutrientes para o hospedeiro, ao antagonismo a patógenos e a própria fixação biológica de nitrogênio, que utiliza o Fe como cofator para a enzima nitrogenase (Beneduzi et al., 2012; Kraepiel et al., 2009) .

**Tabela 11.** Distribuição dos isolados positivos produção de sideróforos cultivadas em meio CAS sólido .

Isolado	Sid	Isolado	Sid	Isolado	Sid	Isolado	Sid	Isolado	Sid
EMFC01	-	EMFC43	+	EMFC90	+	EMFC131	-	EMFC169	-
EMFC02	-	EMFC44	+	EMFC91	+	EMFC132	+	EMFC170	-
EMFC03	-	EMFC45	-	EMFC92	+	EMFC133	+	EMFC171	+
EMFC05	-	EMFC47	-	EMFC93	+	EMFC134	-	EMFC172	+
EMFC06	+	EMFC48	-	EMFC94	+	EMFC135	-	EMFC174	+
EMFC07	-	EMFC49	-	EMFC95	-	EMFC136	-	EMFC176	+
EMFC08	-	EMFC50	+	EMFC96	-	EMFC137	-	EMFC177	-
EMFC09	-	EMFC51	-	EMFC97	-	EMFC138	-	EMFC178	-
EMFC10	+	EMFC52	-	EMFC98	-	EMFC139	+	EMFC179	-
EMFC11	-	EMFC53	-	EMFC99	-	EMFC140	+	EMFC180	-
EMFC12	+	EMFC55	-	EMFC100	-	EMFC141	-	EMFC181	-
EMFC13	+	EMFC56	-	EMFC101	-	EMFC142	-	EMFC182	+
EMFC14	+	EMFC57	+	EMFC103	+	EMFC143	-	EMFC183	+
EMFC15	+	EMFC58	+	EMFC105	+	EMFC144	-	EMFC184	+
EMFC16	-	EMFC59	-	EMFC106	-	EMFC145	+	EMFC185	+
EMFC17	-	EMFC60	-	EMFC107	-	EMFC146	-	EMFC186	-
EMFC18	-	EMFC62	+	EMFC108	+	EMFC147	-	EMFC189	-
EMFC21	-	EMFC66	+	EMFC109	+	EMFC148	-	EMFC191	-
EMFC22	+	EMFC67	-	EMFC110	+	EMFC149	-	EMFC192	-
EMFC23	+	EMFC68	-	EMFC111	-	EMFC150	-	EMFC193	+
EMFC24	+	EMFC69	+	EMFC112	-	EMFC151	-	EMFC194	-
EMFC25	-	EMFC70	+	EMFC114	-	EMFC152	-	EMFC197	-
EMFC26	-	EMFC71	-	EMFC115	-	EMFC153	-	EMFC199	-
EMFC27	-	EMFC72	-	EMFC116	-	EMFC154	-	EMFC200	-
EMFC28	+	EMFC73	+	EMFC117	+	EMFC156	-	EMFC202	-
EMFC30	-	EMFC74	+	EMFC118	-	EMFC157	-	EMFC203	+
EMFC31	+	EMFC75	+	EMFC119	-	EMFC158	-	EMFC204	-
EMFC32	-	EMFC77	+	EMFC120	-	EMFC159	-	EMFC205	-
EMFC33	-	EMFC78	-	EMFC122	+	EMFC160	-	EMFC206	+
EMFC34	-	EMFC80	+	EMFC123	+	EMFC161	+	EMFC207	-
EMFC35	-	EMFC82	-	EMFC124	-	EMFC162	-	EMFC208	+
EMFC36	+	EMFC83	+	EMFC125	-	EMFC163	-	EMFC209	-
EMFC37	-	EMFC84	+	EMFC126	-	EMFC164	+	EMFC212	-
EMFC38	-	EMFC85	+	EMFC127	-	EMFC165	-	EMFC214	+
EMFC40	-	EMFC86	-	EMFC128	-	EMFC166	-	EMFC215	-
EMFC41	-	EMFC87	+	EMFC129	-	EMFC167	+		
EMFC42	+	EMFC88	+	EMFC130	+	EMFC168	+		

Sid: Sideróforo.

#### 4.4 Caracterização Molecular

Dos 183 isolados avaliados, apenas 128 foram utilizados para a análise da variabilidade genética por BOX-PCR, pois não foi possível conseguir extrair DNA viável em tempo hábil para o trabalho. Foi utilizada a linhagem CMPC 71, identificada como *Burkholderia cepacia*, como testemunha, por ter perfil genético conhecido. Foram visualizados perfis de banda que variaram de 8000 a 300 pb. De posse dos dados, foi construído um dendrograma de similaridade a partir dos dados gerados pela amplificação do primer BOX-A1R (figura 29).

A análise indicou grande variabilidade entre os perfis de banda dos isolados gerados pelo BOX-PCR. A maior a maior parte dos agrupamentos se diferenciou quando observado a 70% de similaridade. A exceção ficou por conta dos isolados EMFC 144 e EMFC145, também entre os isolados EMFC186 e EMFC200, que apresentaram similaridade genética acima de 90%. E entre 60 e 70% de similaridade, encontrou-se agrupamento entre os isolados EMFC182 e a testemunha *Burkholderia cepacia* (C71) e entre os isolados EMFC114 e 34.

Os isolados EMFC144 e EMFC145 foram isolados do caule do genótipo TSKC x CTSW – 028, enquanto que os isolados EMFC186 e EMFC200 foram isolados do nicho raiz dos genótipos TSKCX x (TR x LCR) 059 e Citrandarin San Diego 314. O isolado que agrupou com a testemunha, o EMFC71 foi isolado também de raiz do genótipo HTR – 051. Já o isolado EMFC 114 foi isolado como endofítico de folhas do genótipo LCR x TR – 001, enquanto que o isolado EMFC34 foi obtido de folhas do genótipo HTR – 051.

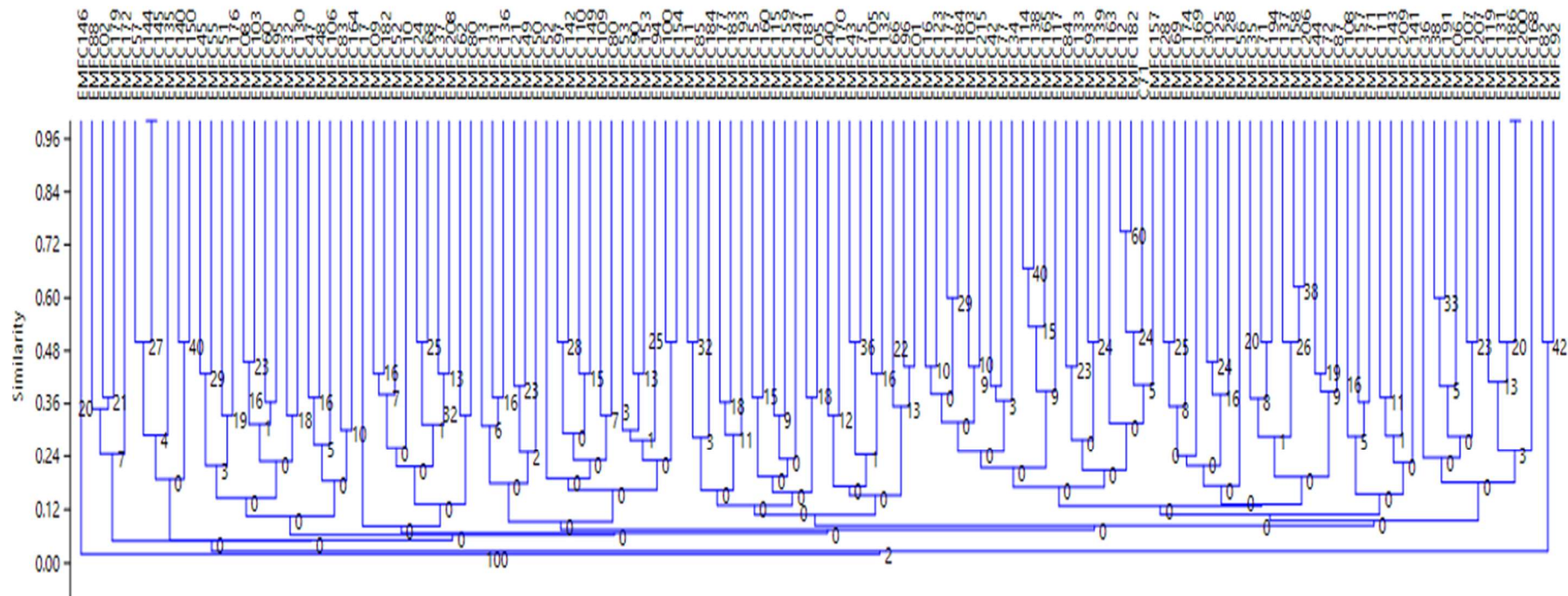
A grande diversidade genotípica encontrada entre os isolados de citros reflete as diferenças do nicho de isolamento e dos genótipos. No trabalho de Li et al. (2010), trabalharam com endofíticas de raízes de algodão e também encontraram alta variabilidade genética entre os isolados, no entanto, diferente deste trabalho, os autores conseguiram agrupar três grandes grupos baseados em 85% de similaridade, enquanto que neste trabalho, tal feito não seria possível devido a grande variabilidade apresentada.

Afirma-se que o BOX-PCR tem capacidade de diferenciar perfis genéticos bacterianos entre diferentes grupos e dentro dos próprios grupos, chegando a nível de diferenciação em espécie. Para confirmar isso, temos o estudo realizado por Marques et al. (2008), que estudaram 120 linhagens de *Pseudomonas*

*syringae*, e *P. Viridiflava* , observaram que os perfis genotípicos dos mesmos, quando agrupados, se diferenciavam e nível de espécie.

Diante do exposto, foi possível observar o comportamento e compreender de uma melhor forma os processos entre hospedeiro e comunidade microbiana. Existe uma grande diversidade e conseqüentemente um grande potencial biotecnológico a ser acessado e utilizado.

A associação de bactérias com híbridos de citros tem sido pouco abordada na literatura, e este trabalho deixa abertas novas possibilidades desenvolvimento de estudos, já que demonstraram grande potencial de serem promotoras do crescimento de plantas.



**Figura 28.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens bacterianas associadas a plantas híbridas de citros, com base nas sequências obtidas pelo *primer* BOX A1R, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso.

## 5. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que:

- A combinação genótipo e porta enxerto e os nichos de isolamento influenciaram diretamente o comportamento das bactérias associadas a estes.
- As bactérias isoladas da rizosfera e endofíticas de citros apresentam grande potencial para a produção de amilases, celulases e pectinases.
- Bactérias isoladas de citros apresentaram altos índices de solubilização de P inorgânico in vitro.
- A maioria dos isolados bacterianos foram eficientes em produzir AIA;
- Os isolados de citros foram positivos para fixação biológica de nitrogênio e para produção de sideróforos.
- As bactérias associadas a plantas híbridas de citros apresentam alta variabilidade genética.
- Isolados bacterianos associados a *Citrus* sp. apresentam potencial para se tornarem inoculantes na cultura, possuindo as características necessárias para tanto.



## 6. REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-GARRIDO, J. F. *et al.* Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p.891–904, 2012.
- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.
- ALI, B. *et al.* Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 5, p. 542–7, 2009.
- ANDRADE, L. F. *et al.* Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27–34, 2014.
- ANDREOTE, F. D. *et al.* Endophytic population of *Pantoea agglomerans* in citrus plants and development of a cloning vector for endophytes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 338–346, 2008.
- ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Diversidade molecular de micro-organismos endofíticos. Parte II - Microrganismos promotores de crescimento em plantas. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P. & SANTOS, C.E.R.S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: O novo desafio para agricultura**. Guaíba, Agrolivros, 2008. p.233-258.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.4906–4914, 2002.
- ARAVIND, R. *et al.* Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 1, p. 58–64, j2009.
- ARFAOUI, A. *et al.* Identification of Rhizobium isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Ciceris*, the causal agent of fusarium wilt of chickpea. v. 88, p. 67–75, 2006.

ASRAFUL, S. M. I. *et al.* Effect of Plant Age on Endophytic Bacterial Diversity of Balloon Flower (*Platycodon grandiflorum*) Root and Their Antimicrobial Activities. **Current Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 346–356, 2010.

ASSUMPÇÃO, L. D. C. *et al.* Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503–510, 2009.

AUGUSTO, R. *et al.* Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 297–306, 2009.

AZEVEDO, J. . **Microrganismos endofíticos. Ecologia microbiana**, 1998.

AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms : a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40–65, 2000.

BACH, E. *et al.* Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 99, p. 141–149, 2016.

BACILIO- JIMÉNEZ, M. *et al.* Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. **Plant and Soil**, v. 249, p. 271–277, 2003.

BAIS, H. P. *et al.* The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual review of plant biology**, v. 57, p. 233–66, 2006.

BARAZANI, O. Z.; 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.

BARBOSA, M. V. (2010). **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas em Pernambuco**. Monografia (Graduação). Curso de Agronomia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 72f.

BARRY, S. M.; CHALLIS, G. L. Recent advances in siderophore biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 2, p. 205–215, 2009.

BENEDUZI, A. *et al.* Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. **Research in microbiology**, v. 159, n. 4, p. 244–50, 2008.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1044–1051, 2012.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. D. P.; MACHADO, B. D. C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155–1164, 2002.

BERG, G. *et al.* Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2005.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. Minireview The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673–1685, 2005.

BOIERO, L. *et al.* Phytohormone production by three strains of Bradyrhizobium japonicum and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 4, p. 874–880, 2007.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONET, S. E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. **Appl. Environ. Microbiol.**n. 1, p. 535–538, 1991.

BRUTO, M. *et al.* Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.

BURNS, R. G. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, n. 5, p. 423–427, 1982.

BURNS, R. G. *et al.* Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 58, p. 216–234, 2013.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of Jacaranda decurrens Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 353–

359, 2006.

CARROLL, G. Fungal Endophytes in Stems and Leaves : From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont Author ( s ): George Carroll Published by : Ecological Society of America. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2–9, 2014.

COATTI, G. C.; ANDRADE, D. D. S.; MATOS, M. A. DE. Produção de AIA e Diversidade Fenotípica de Estirpes Elite de Rizóbio Isoladas de Feijoeiro. **Ciência. Biol. Saúde**, v. 12, n. 1, p. 49–53, 2010.

COMPANT, S. *et al.* MINIREVIEW Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

COMPANT, S., KAPLAN, H., SESSITSCH, A., *et al.* Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by Burkholderia phytofirmans strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS microbiology ecology**, v. 63, n. 1, p. 84–93, 2008.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of Phytohormones by Plant-Associated Bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1–18, 1995.

CRUZ, M. D. C. M. DA *et al.* Teores de carboidratos em Limeiras Ácidas “ Tahiti ” tratadas com Paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 2, p. 222–227, 2007.

CUNHA SOBRINHO, A. P. *et al.* (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília-DF: Embrapa, 2013. 399 p.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 61, p. 401–22, jan. 2007.

DAVIES, P. J. **Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction,**

**action!**.Cornel University, Ithaca-NY, USA. 3<sup>a</sup> Ed. 2010. 835p.

DIAS, A. C. F. *et al.* Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 189–195, 2008.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Critical Reviews in Plant Sciences Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. L. D.; BALDANI, V. DE O. **Documentos 110-Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia** EMBRAPA-CNPAB, 1999, Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/27335/1/doc110.pdf>>. Acessado em : 25 de maio de 2015.

DOORNBOS, R. F.; LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 227–243, 2011.

DOORNBOS, R. F.; LOON, L. C. VAN; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere . A review. **Agron. Sustain. Dev**, v. 32, p. 227–243, 2012.

EGAMBERDIEVA, D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 4, p. 861–864, 20 mar. 2009.

ELSAS, J. . VAN *et al.* **Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment****Journal of Microbiological Methods**, 1998.

ELSAS, J. D. VAN; BOERSMA, F. G. H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 2, p. 77–87, mar. 2011.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Rhizosphere and endorhiza of oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant harbor bacteria with multifaceted beneficial effects.

**Biological Control**, v. 94, p. 11–24, 2016.

FARIA, D. C. *et al.* Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 217–221, 2013.

FAOSTAT - **Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics**. Accessed in <<http://faostat.fao.org>> Acessado em: 22/05/2015.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 3, p. 626–31, 2006.

GAGNE-BOURGUE, F. *et al.* Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. **Journal of Applied Microbiology**, 2013.

GERMIDA, J. J. *et al.* Diversity of root-associated bacteria associated with held-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **Fems Microbiology Ecology**, v. 26, n. 1, p. 43–50, 1998.

GIONGO, A. *et al.* Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) L.B. Smith (Bromeliaceae). **Biota Neotrop**, v. 13, n. 3, p. 80–85, 2013.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

**GOMES, Pimentel. Fruticultura brasileira. NBL Editora, 1973.**

Gomes, R. P. **Fruticultura brasileira**, 13ed. São Paulo: Nobel. 2007.

\_\_\_\_. **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**. [s.l.] Springer, 2015.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 135–141, 2007.

HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.

HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton : location and interaction with other plant-associated bacteria. v. 259, p. 254–259, 1997.

HALLMANN, J.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. v. 914, p. 895–914, 1997.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1975.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–71, out. 2008.

HAYAT, R. *et al.* Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 28 ago. 2010.

HUNG, P. Q.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine sp.*). **Omonrice**, v. 12, p. 92–101, 2004.

HUNGRIA, M. Comunicado 79 Técnico. 2008.

IBEKWE, A. M. *et al.* Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 567–575, 2010.

IBGE(C): **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola** <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201504\\_6.shtml](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201504_6.shtml)> em 12 de maio de 2015

IKEDA, A. C. *et al.* Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154–160, 2013.

JALGAONWALA, R. E.; MAHAJAN, R. T. Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from. **Biotechnology Advances**, v. 7, n. 6, p. 1733–1741, 2011.

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

JHA, B. *et al.* Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 62–72, 2009.

KHAN, A. G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 4, p. 355–364, 2005.

KRAEPIEL, A. M. L. *et al.* Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria. **BioMetals**, v. 22, n. 4, p. 573–581, 2009.

KRAVCHENKO, L. V. *et al.* The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. **Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 156–158, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAI, J. *et al.* Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–51, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; LUIZ ARAÚJO, W. L.; MENDES, R., *et al.* Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v. 273, n. 1-2, p. 91–99, jun. 2005.

KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, n. 3, p. 301–305, 1999.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. DE. Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251–257, 2003.

LACAVA, P. T. *et al.* Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 55–59, 2004.

LACAVA, P. T. *et al.* Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuaria**



**Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 637–642, 2006.

LAMBRECHT, M. *et al.* Indole-3-acetic acid: A reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298–300, 2000.

LATA, H. *et al.* Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinacea plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 85, n. 3, p. 353–359, 2006.

LEE, A.; WONG, E. Optimization and the Robustness of BOX A1R PCR for DNA Fingerprinting Using Trout Lake *E. coli* Isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)**, v. 13, p. 104–113, 2009.

LESSA, L. S. *et al.* Avaliação agronômica em híbridos diplóides (AA) de Bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. Edição Especial, p. 1716–1721, 2009.

LI, C. H. *et al.* Population dynamics and identification of endophytic bacteria antagonistic toward plant-pathogenic fungi in cotton root. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 2, p. 344–356, 2010.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, p. 606–618, 2011.

LONG, H. H. *et al.* The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. **The New phytologist**, v. 185, n. 2, p. 554–67, 2010.

LONG, H. H.; SCHMIDT, D. D.; BALDWIN, I. T. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, 2008.

LOUDEN, B. C.; LYNNE, A. M.; HAARMANN, D. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. **Journal of Microbiology & Biology Education**, v. 12, n. 1, p. 51–53, 2011.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 63, n. c, p. 541–56, jan. 2009.

MARIANO, R. DE L. 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**, 2004.

MARQUES, A. S. A. *et al.* BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, v. 115, n. 1, p. 106–115, 2008.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis – model and research methods. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 883–894, 2011.

MATTOS, K. A *et al.* Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 3, p. 477–93, 2008.

MENDES, R. *et al.* Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane : Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, n. 22, p. 7259–7267, 2007.

MOREIRA, M. F. D. S. *et al.* Bactérias diazotróficas associativas : diversidade , ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.

NEILANDS, J. B. Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, n 45, p. 26723–26726, 1995.

NGUYEN, D. D. LE *et al.* Determination of citrus fruit origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR- DGGE: an application to clementine from Morocco and Spain. **Fruits**, v. 63, p.75-84, 2008.

NOVAIS, Roberto Ferreira et al. (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017 p.

ODEE, D. W. *et al.* Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil and Biochemistry**. v. 34,p. 801-811, 2002.

OVERBEEK, L. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 64, n. 2, p. 283–296, 2008.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207–20,1996.

PELZER, G. Q. *et al.* Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**. v. 36, n. April, p. 95–103, 2011.

PEREIRA, S. I. A. *et al.* Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. **Ecological Engineering**, v. 87, p. 91–97, 2016.

PROCÓPIO, R. E. L. *et al.* Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 8, n. 4, p. 1408–22, 2009.

REIS, V.; OLIVARES, F. Vias de Penetração e Infecção de Plantas por Bactérias. **Documento 216 (Embrapa)**, p. 34p, 2006.

REIS, Veronica Massena; TEIXEIRA, KR dos S. Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte. **Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 151-80, 2005.

RICHARDSON, A. E. *et al.* Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305–339, 2009.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n.

8, p. 827–37, 2006.

RUDRAPPA, T. *et al.* Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial. **Plant physiology**, v. 148, n. November, p. 1547–1556, 2008.

RYAN, R. P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, jan. 2008.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 2011, p. 1–30, 2011.

SALA, V. M. R. *et al.* Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 1, p. 345–352, 2005.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 835–842, 2003.

SANTANA, M. B. *et al.* Atributos físicos do solo e distribuição do sistema radicular de citros como indicadores de horizontes coesos em dois solos de tabuleiros costeiros do estado da Bahia. **Revista Brasileira De Ciencia Do Solo**, v. 30, n. 1, p. 1–12, 2006.

SANTOYO, G. *et al.* Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. **Microbiological Research**, 2015.

SANTOYO, G., MORENO-HAGELSIEB, G., *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, n. February, p. 92–99, 2016.

SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Update on Phosphorus Uptake Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. **Plant physiology**, v. 116, p. 447–453, 1998.

SCHALK, I. J.; BRAUD, A. Minireview New roles for bacterial siderophores in metal transport. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 2844–2854, 2011.

SCHALK, I. J.; GUILLON, L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 1661–1673, 2013.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. What are Endophytes? In: SCHULZ B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (Org.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 2006, p. 1–13.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.

SILVA, M. C. de B. **Bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana-de-açúcar em solos da Zona da Mata de Pernambuco**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Produção Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2012. Cap. 1.

SILVA, M. DE O. *et al.* Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 36, n. 4, p. 1113–1121, 2012.

SINGH, B. K. *et al.* Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. **Applied Soil Ecology**, v. 41, n. 3, p. 239–248, 2009.

SOUCHIE, E. L.; CARLOS, A.; ABBOUD, D. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11–18, 2007.

SOUZA, L. DA S.; SOUZA, L. D. **Caracterização físico-hídrica de solos da área do centro nacional de pesquisa de mandioca e fruticultura** . [s.l: s.n.].

SOUZA, P. M. DE; MAGALHÃES, P. DE O. E. Application of microbial -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850–861, 2010.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. 1–13, 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–48, 2007.

SURETTE, M. A. *et al.* Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota*

L. var. *sativus*): their localizations, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant and Soil**, v. 253, p. 381-390, 2003.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. *et al.* Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 26, p. 1–9, 2014.

TAURIAN, T. *et al.* Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v. 329, n. 1-2, p. 421–431, 25 set. 2009.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

TEIXEIRA, D. DO CARMO *et al.* “Candidatus Liberibacter americanus”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1857–1862, 2005.

TING, A. S. Y. *et al.* Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, v. 53, p. 541–553, 2008.

TIRONI, S. P. *et al.* Action of herbicides on the activity of phosphate-solubilizing bacteria isolated from sugarcane. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 747–754, 2009.

TOLEDO, B. F. B. DE; MARCONDES, J.; MACEDO LEMOS, E. G. DE. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 384–391, 2009.

TORRES, A. R. *et al.* Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 46, n. 4, p. 373–9, ago. 2008.

TRIVEDI, P.; SPANN, T.; WANG, N. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with Citrus roots in Florida. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 2, p. 324–336, 2011.

TRUYENS, S. *et al.* Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 1, p. 40–50, 2015.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 509–515, 2006.

UENOJO, M.; PASTORE, M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

ULRICH, K.; STAUBER, T.; EWALD, D. *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, n. 3, p. 347–351, 26 mar. 2008.

USDA- United States Department of Agriculture. Citrus: World Markets and Trend. 2015. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/citruswm/2010s/2015/citruswm-01-22-2015.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2015.

VELÁZQUEZ, E. *et al.* Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118–124, 2008.

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, n. 2-3, p. 127–141, 2001.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas**. Embrapa Documentos 234. Brasília-DF . 2007.

YARYURA, P. M. *et al.* Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. **Current microbiology**, v. 56, n. 6, p. 625–32, jun. 2008.