



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MÓNICA YORLADY ALZATE ZULUAGA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum*) E LULO (*Solanum quitoense*):
INFLUÊNCIA DO EFEITO RIZOSFERA**

MÓNICA YORLADY ALZATE ZULUAGA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE TOMATE
(*Solanum lycopersicum*) E LULO (*Solanum quitoense*):
INFLUÊNCIA DO EFEITO RIZOSFERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Zuluaga, Mónica Yorlady Alzate .

Caracterização Bioquímica e Molecular de Bactérias Diazotróficas Isoladas de Tomate (*Solanum lycopersicum*) e Lulo (*Solanum quitoense*): Influência do Efeito Rizosfera / Mónica Yorlady Alzate Zuluaga. - Londrina, 2016.
134 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez Oliveira.
dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal - Teses. 2. Biodiversidade Bacteriana - Teses. 3. Exsudatos - Teses. 4. Rhizobium - Teses. I. Oliveira, André Luiz Martinez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

MÓNICA YORLADY ALZATE ZULUAGA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)
E LULO (*Solanum quitoense*): INFLUÊNCIA DO EFEITO RIZOSFERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Diva de Souza Andrade
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Profa. Dra. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de fevereiro de 2016.

Aos meus pais pelas maravilhosas lembranças...

AGRADECIMENTOS

À fundação CAPES pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Ao meu orientador Professor Dr. André Luiz Martinez pela confiança depositada em mim ao assumir a orientação, pela sua paciência, disponibilidade e ensinamentos.

Aos professores do programa de pós-graduação em biotecnologia pelos ensinamentos, colaboração, discussões e reflexões que ajudaram na produção de conhecimento e investigação.

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez pela ajuda e disposição.

Ao Professor Dr. Leandro Simões Azeredo do Centro de Ciências Agrárias pela ajuda com a execução do trabalho em casa de vegetação e pelas análises químicas dos solos.

Aos meus pais que mesmo não estando comigo no plano físico sempre tem estado no meu coração e são a fonte de força e inspiração de todos os projetos da minha vida. Também a meu irmão David pela sua amizade.

A minha filha Isabelli por existir e ser um dos motivos da minha felicidade e ao seu pai Luis pela ajuda e compreensão.

A Esperanza Daza por ser como uma mãe, pelos conselhos e pelo amor.

A Karina Milani, porque aos poucos foi se tornando em uma das minhas amigas mais prezadas, um verdadeiro tesouro do coração. Obrigada pelos momentos compartilhados.

A Alejandra Giraldo pela sua amizade, apoio e momentos compartilhados.

A Kamila Kock e Andressa Jacqueline pelas risadas, pelas saídas gastronômicas e principalmente pela sua amizade.

Aos colegas de curso e do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, com quem compartilhei alegrias, tristezas e preocupações, principalmente Janaina, Mikaela e Heder.

Aos colegas do laboratório Amanda Aleixo, Nicole Pan, Mayara Barbosa, Odair Pais, Clério Junior pelas conversas compartilhadas, aprendizado e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos estagiários Amanda Paiter, Diana Lezier, Douglas Nogueiro, e Maria Paula pela ajuda, descontração e conversas.

A Silvia Borba pelos conselhos e pela amizade.

A minhas amigas irmãs de coração Luisa Hoyos, Lorena Ocampo, Mónica Ibarquen e Marcela Bernal que mesmo longe sempre me dão a força para continuar com os meus sonhos.

A todos que fazem parte da minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui

E finalmente agradeço a Deus por estar sempre no comando da minha vida.

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos"

Charles Chaplin

ZULUAGA, Monica Yorlady Alzate. **Caracterização bioquímica e molecular de bactérias diazotróficas isoladas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e lulo (*Solanum quitoense*): influência do efeito rizosfera.** 2016. 134 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O solo é um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana, constituindo um importante recurso para a exploração biotecnológica. Esta biodiversidade não se distribui uniformemente neste ambiente, e a cobertura vegetal exerce grande influência sobre a diversidade microbiana do solo. Este fenômeno é conhecido como efeito rizosfera, onde algumas espécies têm suas populações aumentadas conforme a qualidade e quantidade de material exsudado pelas raízes. Nesse sentido, torna-se interessante o estudo da interação de algumas culturas de importância econômica com bactérias do solo que possam promover seu crescimento. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito rizosfera promovido por duas espécies de *Solanum*, *S. lycopersicum* (tomate) e *S. quitoense* (lulo) sobre a comunidade de bactérias diazotróficas em solos sob diferentes tipos de manejo: mata secundária (MS), hortícola convencional (HC) e orgânico (ORG). As bactérias diazotróficas foram isoladas usando meios semi-sólidos livres de nitrogênio (JMV, NFb, JNFb, LGI e LGI-P) e sua população foi quantificada pela técnica do número mais provável (NMP). O posicionamento taxonômico dos isolados foi realizado pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr, aplicando o índice de Shanon-Wiener para determinar variações na biodiversidade entre os tratamentos. Os isolados foram avaliados para características de promoção do crescimento vegetal, como a capacidade de produção de compostos indólicos, produção de sideróforos e solubilização de fosfatos inorgânicos. Foram obtidos 117 isolados bacterianos em populações acima de 1×10^4 células g^{-1} rizosfera ou solo, dos quais 114 foram posicionados taxonomicamente dentro dos seguintes gêneros: *Rhizobium* (60 isolados); *Pseudomonas* (15 isolados); *Burkholderia* (12 isolados); *Enterobacter* e *Variovorax* (6 isolados cada); *Cupriavidus* e *Massilia* (3 isolados cada); *Stenotrophomonas* e *Roseateles* (2 isolados cada); *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Xanthomonas*, *Novosphingobium* e *Caulobacter* (um isolado cada). Houve diferença tanto na composição qualitativa como quantitativa da comunidade diazotrófica associada às diferentes espécies de *Solanum*, com diminuição da diversidade de diazotrofos na rizosfera de *S. lycopersicum* e *S. quitoense* em comparação ao solo, e incremento na população de diazotrofos na rizosfera – principalmente de *Rhizobium* na rizosfera de *S. lycopersicum*, independentemente do manejo de solo estudado. A caracterização bioquímica identificou a capacidade de produção de compostos indólicos em 54 isolados, a produção de siderofóros em 49 isolados, a capacidade para solubilizar $FePO_4$ foi detectada em 84 isolados e a solubilização de $AlPO_4$ em 49 isolados. Dentre a coleção de isolados obtida, 49% apresentaram potencial aplicação na promoção do crescimento de tomate, onde 32% correspondem a isolados provenientes do solo, 40% da rizosfera de tomate e 28% da rizosfera de lulo.

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento vegetal. Biodiversidade bacteriana. Exsudatos. *Rhizobium*.

ZULUAGA, Monica Yorlady Alzate. **Molecular and biochemical characterization of diazotrophic bacteria associated with tomato (*Solanum lycopersicum*) and lulo (*Solanum quitoense*): influence of rhizosphere effect.** 2016. 134 p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Soil is one of the largest reservoirs of microbial biodiversity and an important resource for biotechnological exploitation. Such biodiversity is not evenly distributed in this environment, and the plant cover exerts great influence on the soil microbial community composition. This phenomenon is known as rhizosphere effect, inducing some bacterial species to increase their populations according to the quality and quantity of root exudates. In this sense, is important to study the interactions of some economically important crops with soil bacteria that may promote their growth. Thus, the aim of this study was to evaluate the rhizosphere effect promoted by two *Solanum* species, *S. lycopersicum* (tomato) and *S. quitoense* (lulo) on the community of nitrogen fixing-bacteria in soils under different three types of management as secondary forest (SF), conventional horticultural (CH) and organic (ORG). The nitrogen fixing bacteria were isolated using nitrogen-free semi-solid media (JMV NFb, JNFb, LGI and LGI-P) and its population were quantified by the most probable number (MPN) technique. The taxonomic position of isolates was performed by the partial sequencing of the 16S rRNA gene, using the Shannon-Wiener index to determine variations in biodiversity between treatments. The isolates were also characterized for its plant growth-promotion traits, as indole compounds production, siderophores production and solubilization of inorganic phosphates. A total of 117 bacterial isolates in populations above 1×10^4 cells g^{-1} of rhizosphere or soil were obtained and taxonomically positioned within the following genera: *Rhizobium* (60 isolates); *Pseudomonas* (15 isolates); *Burkholderia* (12 isolates); *Enterobacter* and *Variovorax* (6 isolates each); *Cupriavidus* and *Massilia* (3 isolates each); *Stenotrophomonas* and *Roseateles* (2 isolates each); *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Xanthomonas*, *Novosphingobium* and *Caulobacter* (a single isolate each). Differences in the qualitative and quantitative composition of diazotrophic community associated to different *Solanum* species were found, with lower diazotroph diversity in the rhizosphere of *S. lycopersicum* or *S. quitoense* as compared to soil, although its population size was increased in the rhizosphere of *S. lycopersicum* - mainly related to *Rhizobium* isolates, regardless the soil management studied. The biochemical characterization of isolates allowed the identification of 54 isolates with indole compounds production ability, siderophores production ability in 49 isolates, FePO₄ solubilization ability was detected in 84 isolates and AlPO₄ solubilization was observed in 49 isolates. From the total of isolates obtained, 49% showed potential application as tomato growth-promoters, from which 32% were isolated from soil, 40% from the tomato rhizosphere and 28% from the rhizosphere of lulo.

Keywords: Plant growth promoting bacteria. Bacterial biodiversity. Root exudates. *Rhizobium*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistemas de crescimento do tomate.....	20
Figura 2 - Lulo (<i>Solanum quitoense</i> Lam.).....	22
Figura 3 - Aspectos morfológicos do Lulo (<i>Solanum quitoense</i> Lam.).....	23
Figura 4 - Fatores que influenciam as interações na rizosfera	31
Figura 5 - Bactérias promotoras do crescimento vegetal mais estudadas em plantas de tomate, agrupadas de acordo com sua classificação filogenética	34
Figura 6 - Algumas formas de promoção do crescimento vegetal	36

LISTA DE FIGURAS NO ARTIGO

- Figura 1** - Abundância relativa dos diferentes gêneros de bactérias diazotróficas isoladas de solos não rizosféricos sob diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantadas nesses tipos de solos (TOM/MS, TOM/HC, TOM/ORG, LULO/MS, LULO/HC e LULO/ORG), determinada pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr.....94
- Figura 2** - Índice de diversidade de Shanon-Wiener de solos não rizosféricos sob diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantadas nesses tipos de solos (TOM/MS, TOM/HC, TOM/ORG, LULO/MS, LULO/HC e LULO/ORG), determinado pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr94
- Figura 3** - Distribuição dos isolados obtidos conforme o posicionamento taxonômico em relação à (a) produção de compostos indólicos, (b) solubilização de FePO_4 , (c) solubilização de AlPO_4 , e (d) produção de sideróforos.....98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Algumas definições utilizadas para descrição da diversidade microbiana.....	26
Tabela 2 -Composição microbiana presente na rizosfera de trigo e em solo não rizosférico, e magnitude do efeito rizosfera sobre cada grupo filogenético	30

LISTA DE TABELAS NO ARTIGO

Tabela 1 -	Características químicas dos solos utilizados neste estudo.....	84
Tabela 2 -	Número de bactérias diazotróficas isoladas de solos não rizosféricos com diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, utilizando os meios semi-sólidos livres de nitrogênio JMV, NFb, JNFb, LGI e LGI-P.....	89
Tabela 3 -	Densidade populacional de microrganismos diazotróficos $\text{Log}_{10}(\text{NMP} \times 10^4 \text{ células g}^{-1})$ de solos não rizosféricos com diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, utilizando os meios semi-sólidos livres de nitrogênio JMV, NFb, JNFb, LGI e LGI-P.....	90
Tabela 4 -	Efeito rizosfera (relação R/S) do tomate e do lulo utilizando solos com diferentes tipos de manejo (mata secundária-MS, hortícola convencional-HC e orgânico-ORG).....	91
Tabela 5 -	Identificação taxonômica das bactérias isoladas dos solos não rizosféricos sob diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos (TOMATE/MS, TOMATE/HC, TOMATE/ORG, LULO/MS, LULO/HC e LULO/ORG), conforme o resultado do sequenciamento parcial do gene 16S RNAr	93
Tabela S1 -	Concentração de indoles em cultivos de diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por 48 horas em meio líquido contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano	115
Tabela S2 -	Concentração de P solúvel em cultivos de diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por 7 dias em meio líquido contendo 0,1% de P na forma insolúvel de FePO_4	117

Tabela S3 - Concentração de P solúvel em cultivos de diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por 7 dias em meio líquido contendo 0,1% de P na forma insolúvel de AlPO_4	119
Tabela S4 - Capacidade quelantes de ferro apresentada por diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por 5 dias em meio sólido contendo 1 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e interpretada como capacidade de produção de sideróforos.....	120
Tabela S5 - Potencial biotecnológico dos isolados segundo a somatória das notas atribuídas para cada atividade apresentada.....	121

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	O TOMATEIRO	19
2.1.1	Origem e Características	19
2.1.2	A Cultura do Tomate	21
2.2	LULO OU NARANJILLA	21
2.2.1	Origem e Características	21
2.2.2	A Cultura do Lulo	23
2.3	PRODUÇÃO VEGETAL E DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES	24
2.4	DIVERSIDADE MICROBIANA	25
2.5	BIODIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	27
2.6	RIZOSFERA E INTERAÇÕES PLANTA-MICROORGANISMOS	28
2.7	BIODIVERSIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA	32
2.8	BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	33
2.8.1	Principais Mecanismos de Ação das BPCV	36
2.8.1.1	Fixação Biológica de Nitrogênio	36
2.8.1.2	Solubilização de Fosfatos	37
2.8.1.3	Produção de Sideróforos	38
2.8.1.4	Produção de Fitormônios	39
2.8.1.5	Controle Biológico	40
2.8.2	Gêneros de BPCV	41
2.8.2.1	<i>Pseudomonas</i>	41
2.8.2.2	<i>Bacillus</i>	42
2.8.2.3	<i>Azospirillum</i>	42
2.8.2.4	<i>Burkholderia</i>	43
2.8.2.5	<i>Enterobacter</i>	44
2.8.2.6	<i>Rhizobium</i>	45
3	OBJETIVOS	46
3.1	OBJETIVO GERAL	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46

4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	ISOLAMENTO DAS RIZOBACTÉRIAS.....	47
4.1.1	Coleta das Amostras de Solo.....	47
4.1.2	Preparo dos microcosmos para determinação do efeito rizosfera de tomate e lulo.	47
4.1.3	Isolamento de Microrganismos	48
4.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	49
4.2.1	Extração do DNA Genômico Total	49
4.2.2	Quantificação, Pureza e Integridade do DNA.....	50
4.2.4	Amplificação e Sequenciamento parcial do gene 16S RNAr	51
4.2.4.1	Amplificação do gene 16S RNAr por PCR	51
4.2.4.2	Purificação dos produtos da amplificação	52
4.2.4.3	Reações de PCR, precipitação e sequenciamento	52
4.2.5	Análise Filogenética e Determinação dos Índices de Biodiversidade.....	53
4.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS.....	53
4.3.1	Produção de Compostos Indólicos.....	53
4.3.1.1	Dosagem de Compostos Indólicos.....	53
4.3.1.2	Determinação de Proteínas.....	54
4.3.2	Solubilização de Fosfatos	54
4.3.3	Produção de Sideróforos.....	55
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
	REFERÊNCIAS	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1	ARTIGO	79
6	CONCLUSÕES	125
	ANEXOS	126
	ANEXO 1 - Solução Salina para Diluição Seriada.....	126
	ANEXO 2 - Meios de Ciltivo Semi-Seletivos	126
	ANEXO 3 - Meio Dygs.....	128
	ANEXO 4 - Normas para a Submissão do Artigo para o Periódico Plant and Soil.....	128

1 INTRODUÇÃO

A família Solanaceae é caracterizada por muitas espécies vegetais de interesse agrícola. O gênero *Solanum* tem sido particularmente notável por fornecer algumas espécies olerícolas que atualmente são consideradas alimentos de importância econômica e industrial. Dentre as espécies de *Solanum* mais amplamente utilizadas pelo homem, encontram-se a batata (*S. tuberosum*), berinjela (*S. melongena*) e tomate (*S. lycopersicum*). Outras espécies de *Solanum* que merecem atenção, por serem valorizadas por suas frutas na América do Sul, são o tomate-arbóreo (*S. betaceum*), melão-pera (*S. muricatum*) e lulo (*S. quitoense*) (HEISER; ANDERSON, 1999).

O tomateiro tem seu centro primário de origem nas regiões andinas do Peru, Bolívia, Equador, Colômbia e Chile (GARDÉ; GARDÉ, 1964; PERALTA; SPOONER, 2007). Atualmente, a cultura está espalhada por todo o mundo e, depois da batata, é o produto olerícola mais cultivado (FILGUEIRA, 2003). Dentre as solanáceas produzidas no Brasil, o tomate é uma das espécies mais importantes, devido ao volume da produção e geração de empregos. Informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que a produção de tomate no Brasil em 2014 alcançou 4.291.160 toneladas, um crescimento de 7,4% em relação a 2013. Tal incremento na produção é atribuído principalmente à industrialização em larga escala, resultante do aumento na demanda por alimentos preparados nas diferentes formas (CAMARGO et al., 2006).

Outra solanácea que vem sendo explorada nos últimos anos por seu potencial comercial é o lulo (*S. quitoense*). Considerada uma planta de grande interesse no mercado de produtos exóticos, esta frutífera tem seu centro de diversidade distribuído na região andina da Colômbia e do Equador (HEISER, 1985; ACOSTA et al., 2009). Embora o lulo apresente características e distribuição geográfica bem definidas para as áreas de sua ocorrência natural, pesquisas sobre esta cultura vêm trazendo boas perspectivas para sua produção no Brasil. A produtividade pode alcançar de 10 a 15 kg planta⁻¹ ano⁻¹, por esta razão tem grande potencial agrícola e comercial para pequenos e médios agricultores (SOUZA, 2009).

Tanto o tomate quanto o lulo apresentam uma característica em comum: ambas são espécies consideradas exigentes em adubação. A quantidade de nutrientes extraída pelo tomateiro é relativamente pequena, mas a exigência em

adubação é muito grande, pois a eficiência de absorção dos nutrientes pela planta é baixa. Para os fertilizantes fosfatados, por exemplo, a taxa de absorção é de aproximadamente 10%. O restante fica no solo, na forma de resíduo, podendo ser absorvido por plantas daninhas, ser transportado pela água ou ser retido pelas partículas do solo (EMBRAPA, 2006). As recomendações sobre a aplicação de fertilizantes no lulo devem considerar as condições e manejo prévios do solo (BERNAL et al., 1996).

Embora o uso de fertilizantes químicos ajude a corrigir as deficiências do solo para garantir a qualidade dessas culturas, seu uso excessivo traz sérias consequências ao meio ambiente, empobrece a fertilidade do solo, torna as culturas suscetíveis a doenças e aumenta a vulnerabilidade a pragas. Neste contexto, a biofertilização com microrganismos apresenta-se como uma potencial alternativa para alcançar níveis elevados de produtividade em sintonia com a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (OLIVEIRA et al., 2014). Dentre as vantagens do uso de microrganismos na agricultura, encontram-se a solubilização de nutrientes do solo que as plantas por si não conseguem obter (Van LOON 2007; GLICK et al. 2007), a decomposição da matéria orgânica (NIE et al., 2015), captação de ferro (MARSCHNER et al. 2011), fixação do nitrogênio atmosférico (SANTI et al., 2013), supressão de fitopatógenos (LABUSCHAGNE et al., 2010) e a produção de compostos orgânicos e fitormônios que conduzem ao estímulo do desenvolvimento das plantas (BABALOLA, 2010).

Um dos grupos microbianos que possuem importância em cultivos comerciais corresponde às bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Estas bactérias compreendem parte da microbiota nativa do solo que apresenta capacidade de influenciar positivamente o desenvolvimento das plantas, atuando por mecanismos diretos e/ou por mecanismos indiretos quando inoculadas nas sementes ou no solo (KLOEPPER; SCHROTH, 1978; GUPTA et al., 2015). As BPCV compreendem diversos grupos taxonômicos que colonizam a rizosfera de muitas espécies vegetais, atuando por diferentes mecanismos e possuindo grande potencial para o desenvolvimento de insumos biológicos para a agricultura, como biofertilizantes e agentes de controle biológico (DAS et al., 2013).

Assim como parte da microbiota do solo exerce influência sobre o desenvolvimento das plantas, as plantas também exsudam compostos pelas raízes que favorecem grupos microbianos específicos. Os exsudatos radiculares fornecem

nutrientes para a manutenção destes grupos microbianos, e atuam como determinantes da diversidade das populações microbianas localizadas próximas às raízes, em um fenômeno denominado “efeito rizosfera” (BERENDSEN Et al., 2012; YEVDOKIMOV, 2013). Considerando a porção do solo influenciada diretamente pelo metabolismo das plantas, ou seja, a rizosfera, é difícil prever se a ocorrência de BPCV resultará em efeito positivo sobre o desenvolvimento vegetal, já que existem diversas inter-relações entre os microrganismos presentes nestes ecossistemas, que podem ser sinérgicas, antagônicas e de competição (física e bioquímica), reguladas por diversos e complexos fatores bióticos e abióticos (CANO, 2011). Porém, é certo afirmar que as populações microbianas associadas às raízes exercem um papel chave no desenvolvimento das plantas, e podem ser exploradas na busca por práticas agrícolas sustentáveis (VÁZQUEZ et al., 2000; RYAN et al, 2009; SINGH et al., 2011).

Dessa forma, o estudo dos fatores que regulam a diversidade e atividade dos microrganismos presentes no solo se faz necessário, uma vez que a biodiversidade desse ambiente representa um fator crucial na regulação e funcionamento dos ecossistemas (COPLEY, 2000; CHAPARRO et al., 2012). Além disso, é importante considerar a interdependência das interações planta-microrganismo para o desenvolvimento de associações compatíveis que possam promover respostas positivas sobre a produtividade agrícola (DE SALOMONE et al., 1996; BEVER et al., 2013; TRACZ; POOLE, 2015).

No Brasil, há poucos estudos enfocando o isolamento e a caracterização de BPCV associadas às raízes de plantas de tomate e, até hoje, nenhum estudo foi realizado sobre a associação de BPCV com lulo. Sendo assim, este estudo foi realizado com o propósito de caracterizar, utilizando testes bioquímicos e ferramentas moleculares, a diversidade de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de plantas de tomate e lulo quando crescidas em solos sob diferentes tipos de manejo, e determinar a influência do efeito rizosfera dessas espécies filogeneticamente próximas sobre a diversidade de bactérias nativas dos solos sob os manejos estudados. Espera-se que os resultados obtidos possam contribuir para elucidar a composição da comunidade bacteriana diazotrófica predominante na rizosfera das espécies vegetais estudadas, identificando estirpes eficientes para o desenvolvimento de biofertilizantes para a cultura do tomate.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O TOMATEIRO

2.1.1 Origem e Características

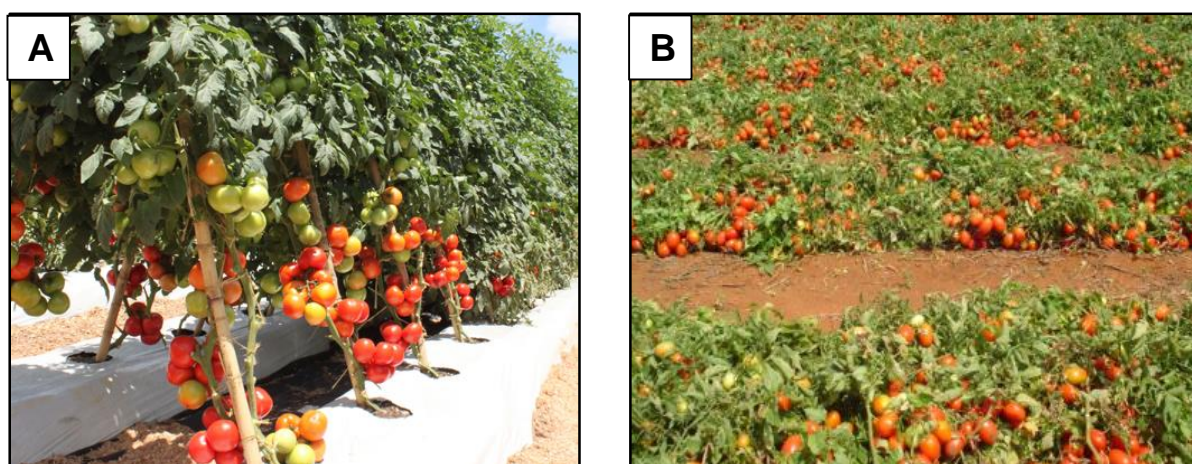
O tomateiro tem seu centro primário de origem nas regiões andinas do Peru, Bolívia, Equador, Colômbia e Chile. Antes da colonização espanhola, o tomate foi levado para o México (centro secundário), onde passou a ser cultivado e domesticado. Foi introduzido na Europa, a partir da Espanha, entre 1523 e 1554. Inicialmente foi considerado mais como planta medicinal ou simples curiosidade ornamental, e não como planta alimentar (GARDÉ; GARDÉ, 1964; FILGUEIRA, 2003; PERALTA; SPOONER, 2007). O tomate é produzido e consumido em numerosos países, como alimento *in natura* ou industrializado. No Brasil, seu hábito de consumo foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX. Hoje, a cultura está espalhada por todo o mundo e, atualmente, é o segundo produto olerícola mais cultivado, sendo a quantidade produzida superada apenas pela batata, que juntamente com a cebola e o alho são os alimentos mais industrializados (FILGUEIRA, 2003).

O tomate pertence à ordem Solanales, família Solanaceae, gênero *Solanum* e o seu nome científico é *Solanum lycopersicum*, sendo aceito também o seu nome homotípico *Lycopersicon esculentum* Mill., conforme consta no Código Internacional de Nomenclatura Botânica (BRICKELL et al., 2004). De acordo com FILGUEIRA (2003), o tomateiro é uma planta herbácea, de caule flexível e incapaz de suportar o peso dos frutos e manter a posição vertical, cuja arquitetura natural lembra uma moita, com abundante ramificação lateral. Essa arquitetura pode ser profundamente modificada pela poda, condicionando o tipo de cultura: rasteiro para a indústria ou cultivo envarado ou estaqueado para consumo ao natural.

A arquitetura do tomateiro é caracterizada por dois tipos de hábito de crescimento. O tipo indeterminado, condicionado pelo alelo dominante Self-Pruning (SP), ocorre na maioria das cultivares para a produção de frutos para consumo ao natural. As plantas são tutoradas sendo necessário o estaqueamento para evitar que os frutos se desenvolvam em contato com o solo, minimizando os problemas com doenças nas folhas e frutos e o caule pode atingir mais de 2,5 m de altura (Figura

1A). O hábito determinado ocorre devido à presença da mutação recessiva self-pruning (*sp*), que apareceu espontaneamente na Flórida em 1914 e sua produção é destinada para industrialização. As plantas destas cultivares são não tutoradas, as hastes atingem apenas 1 m de altura, param de crescer com a frutificação e com o peso da haste se apoiam no solo, daí ser chamado de cultivo rasteiro (Figura 1B) (FILGUEIRA, 2003; MAKISHIMA; MELO, 2005; PIOTTO; PERES, 2012).

Figura 1. Sistemas de crescimento do tomate. (A) crescimento indeterminado; (B) crescimento determinado.



Fonte: (A) NÍTOLO, 2014; (B) LPV ESALQ, 2016

As flores agrupam-se em cachos e são hermafroditas, o que dificulta a fecundação cruzada. Os frutos são bagas carnosas, suculentas, de formas muito variadas (achatada, globosa, ovoide, piriforme, alongada, etc.) e de diferentes cores ou tonalidades desde o amarelo ao vermelho escuro (GARDÉ; GARDÉ, 1964; NAIKA et al., 2006). O peso dos frutos varia de menos de 25 g até mais de 400 g conforme a cultivar. As sementes são pilosas, pequenas e envoltas por mucilagem quando no fruto. O sistema radicular é condicionado pelo tipo de cultura. Na semeadura direta, há maior desenvolvimento no sentido vertical, podendo a raiz principal ultrapassar 2 m de profundidade. Contrariamente, em cultura transplantada, mais de 60% das raízes localizam-se nos primeiros 10 cm do perfil do solo, e as raízes laterais e adventícias desenvolvem-se mais que a principal (FILGUEIRA, 2003).

2.1.2 A Cultura do Tomate

O tomate é uma das principais hortaliças produzidas no Brasil, e segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de tomate no Brasil alcançou 4.291.160 toneladas em 2014, com aproximadamente 65.000 hectares cultivadas. Esta cultura encontra-se concentrada nos Estados de Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná, e em junho de 2015 o Paraná alcançou uma produção de 208.723 toneladas.

A cultura do tomate é formada por duas cadeias produtivas distintas, caracterizadas pelos segmentos de mesa, destinado para o consumo ao natural, e de indústria, destinado ao processamento. Cada cadeia produtiva possui características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização, que compreendem desde as cultivares utilizadas até as formas de cultivo e consumo final (SANTOS, 2009).

Devido à dificuldade de produção do tomate em algumas épocas do ano, a cultura do tomateiro em estufas ou sob cobertura de plástico vem sendo bastante utilizada, com o objetivo de proteger as plantas contra as condições climáticas adversas. Essa tecnologia tem permitido aos agricultores do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná colher tomate no inverno e aos de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, durante o período chuvoso (EMBRAPA, 1993).

O tomateiro é considerado, dentre as hortaliças, uma das espécies mais exigentes em adubação. A quantidade de nutrientes extraída pelo tomateiro é relativamente pequena, mas a exigência em adubação é muito grande, pois a eficiência de absorção dos nutrientes pela planta é baixa. Para os fertilizantes fosfatados, por exemplo, a taxa de absorção é de aproximadamente 10%. O restante fica no solo, na forma de resíduo, podendo ser absorvido por plantas daninhas, ser transportado pela água ou ser retido por partículas do solo (EMBRAPA, 2006).

2.2 LULO OU NARANJILLA

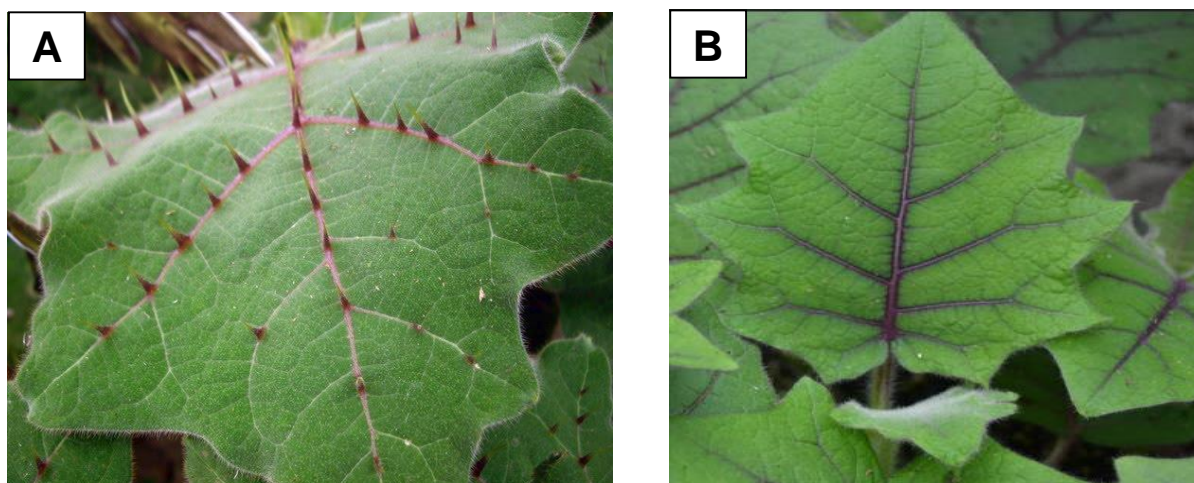
2.2.1 Origem e Características

O lulo tem seu centro de diversidade distribuído na região andina da Colômbia e do Equador, e em meados do século XX foi também introduzido no

Panamá e na Costa Rica (HEISER, 1985), sendo cultivada e consumida principalmente no Equador, Colômbia, e América Central (ACOSTA et al., 2009). Entre os usos, destacam-se o consumo do fruto na forma de sorvetes, geléias, pudins, bolos, néctares, mas principalmente na forma de suco, do qual seu sabor é bastante incomum e sugere uma combinação de suco de laranja e tomate ou de abacaxi e morango (LEDIN, 1952; LIM, 2013).

O lulo pertence à ordem Tubiflorales, família *Solanaceae*, gênero *Solanum* e o seu nome científico é *Solanum quitoense* Lam., com duas variedades botânicas: *septentrionale* e *quitoense*. A primeira é caracterizada pela presença de espinhos no caule e folhas (Figura 2A), enquanto a segunda não tem espinhos (Figura 2B) (HEISER, 1972). O lulo é uma frutífera herbácea, com 1,8 a 3 m de altura (Figura 3A) sendo os frutos cobertos por pubescência lanosa. As folhas (Figura 3B) são grandes, ovaladas e dentadas, podem medir até 50 cm de comprimento e 35 cm de largura, são de cor verde escuro na face adaxial e verde claro na face abaxial, apresentando nervuras roxas e limbo aveludado (FRANCO et al., 2002). As flores (Figura 3C) são brancas ou lilás, pentâmeras, perfeitas e hermafroditas, e em uma mesma inflorescência podem ser encontrados três tipos de flores, de pistilo curto, médio e longo, sendo unicamente férteis as flores com pistilo longo. A polinização de suas flores é cruzada, sendo o vento e os insetos os principais agentes polinizadores (QUINCHIA; CABRERA, 2006).

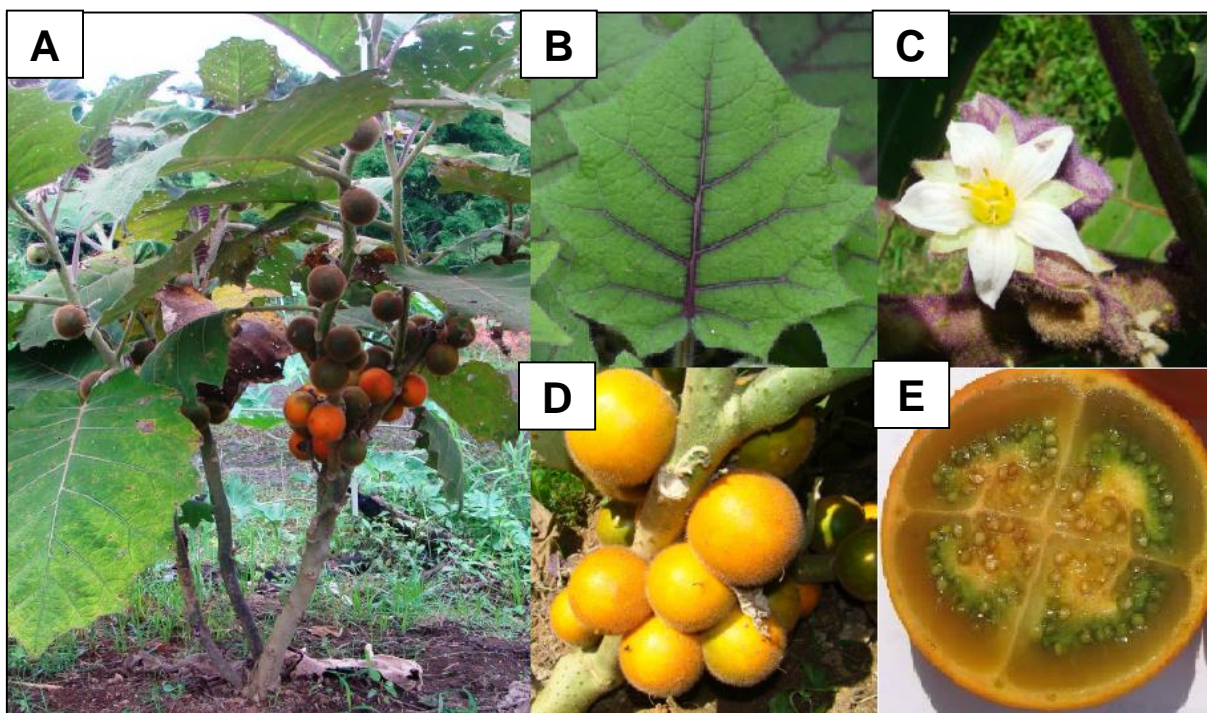
Figura 2. Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). (A) Var. *septentrionale* (B) Var. *quitoense*



Fonte: (A) ÑANDEROGA, 2015; (B) OUTLAW, 2015

Os frutos (Figura 3D) são bagas globosas de cor laranja quando maduros, pesam entre 40 a 100 g e medem de 4 a 8 cm de diâmetro equatorial, são cobertos de pelos curtos que se caem facilmente à medida que os frutos vão amadurecendo. A polpa é verde clara, pegajosa, ácida e succulenta, contendo muitas sementes (Figura 3E). Um fruto pode ter até 1000 sementes, que são lisas e redondas em forma de lentilha. A raiz principal pode ultrapassar 50 cm de profundidade e as raízes laterais apresentam grande desenvolvimento (MEJIA et al., 2012).

Figura 3. Aspectos morfológicos do Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). (A) planta; (B) folhas; (C) flor; (D) fruto; (E) polpa e sementes.



Fonte: Adaptado de MATARAZZO, 2010

2.2.2 A Cultura do Lulo

A Colômbia é o principal produtor mundial de lulo e até 2011 contava com uma produção anual estimada em 21.232 toneladas com um rendimento médio de 8,32 ton/ha (ENA, 2011). O desenvolvimento das plantas de lulo ocorre melhor em áreas com temperaturas entre 15 e 24 °C, com solos úmidos, profundos e bem drenados e pH ligeiramente ácido entre 5,2 a 5,8, precipitação mínima de 1.800 mm/ano, e regiões com altitudes compreendidas entre 1.600 a 2.200 metros acima

do nível do mar (FRANCO et al., 2002; MEDINA et al., 2009).

A propagação do lulo pode ser feita usando sementes, enxertia ou estaquia. As últimas duas técnicas não são muito utilizadas devido à baixa eficiência. Utilizando-se sementes as plantas estão prontas para serem transplantadas para o campo, em aproximadamente dois meses após a semeadura no viveiro (QUINCHIA; CABRERA, 2006). As recomendações sobre a aplicação de fertilizantes devem considerar as condições e manejo prévios do solo (BERNAL et al., 1996).

Embora o lulo apresente características e distribuição geográfica bem definidas nas áreas de ocorrência natural (MESSINGER; LAUERER, 2015), no Brasil, as informações a respeito da sua cultura são ainda escassas. Matarazzo (2010) determinou a curva de desenvolvimento do fruto de lulo, em Viçosa MG, por meio da avaliação das mudanças físicas, químicas e fisiológicas e constatou que aos 95 dias após a antese o lulo pode ser colhido com 100% do pericarpo alaranjado. Em 2012, Nuro, também em Viçosa MG, estudou o acúmulo de nutrientes da cultura de lulo e foi determinado que os nutrientes mais acumulados pela planta foram em ordem decrescente K, N, Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn e Cu, resultado muito parecido ao reportado por Varela et al. (2001) na Colômbia, onde o acúmulo dos nutrientes foi, em ordem decrescente, N, K, Ca, Mg e P.

2.3 PRODUÇÃO VEGETAL E DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES

A agricultura brasileira é voraz no consumo de fertilizantes, sendo o quarto maior consumidor mundial (DAHER, 2008). Entretanto, o nível de dependência do Brasil quanto à importação destes insumos continua a crescer. Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), a produção nacional de fertilizantes apresentou uma queda de 5,1% em 2015 comparativamente a 2014 e a quantidade de fertilizantes entregues ao produtor diminuiu 12,5%, enquanto a produção de grãos e oleaginosas cresceu 8,1% no mesmo período. Em conjunto, estes dados reforçam a ideia de que a produção de fertilizantes não está acompanhando o crescimento das safras brasileiras, e que os agricultores do país continuam dependentes de crescentes importações do insumo, o que pode causar insegurança econômica e levar ao aumento dos custos de produção (SNA, 2015).

Uma das alternativas concretas à diminuição da dependência da agricultura brasileira por fertilizantes minerais e por agroquímicos é a ampliação da

oferta de insumos biológicos de alta eficiência, como ocorre com a tecnologia de inoculação com rizóbios para a soja e pelo uso de microrganismos no controle biológico de pragas. Neste contexto, a tecnologia de inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), mesmo que fundamentadas em microrganismos que apresentem um caráter exótico ao ambiente produtivo, pode auxiliar no encontro da sustentabilidade dos sistemas agrícolas, pois são produzidas e atuam sob baixa demanda de energia (OLIVEIRA et al., 2014).

A principal característica destes microrganismos é a de favorecer o desenvolvimento vegetal por diversos mecanismos que podem ser explorados em benefício de uma agricultura mais sustentável e de menor impacto ambiental, (BULGARELLI et al., 2013). Por exemplo, o incremento no volume radicular promovido pela ação de fitormônios sintetizados por BPCVs pode favorecer a absorção de água e nutrientes, aumentando a eficiência de uso de fertilizantes. Desta forma, a exploração e utilização de microrganismos eficientes na promoção do desenvolvimento vegetal pode auxiliar no encontro da sustentabilidade da atividade agrícola pela diminuição do uso de insumos derivados, direta ou indiretamente, do petróleo (DOBBELAERE et al., 2003; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

2.4 DIVERSIDADE MICROBIANA

O termo diversidade microbiana tem sido usado para descrever a complexidade e variabilidade em diferentes níveis de organização biológica (JOHNSEN et al., 2001; NANNIPIERI et al., 2003). Ela abrange a variabilidade genética dentro de táxons (espécies), e é considerada como uma medida do número (riqueza) e abundância relativa (uniformidade) de espécies e grupos funcionais dentro de comunidades microbianas (ATLAS, 1984; LYNCH et al., 2004). Alguns aspectos importantes da diversidade num ecossistema envolvem a variedade de processos biológicos presentes, a complexidade das interações dos organismos entre si e com o ambiente, e o número de níveis tróficos. Dessa forma, a integração de medidas holísticas no nível da comunidade global, com abordagens parciais que visam subconjuntos estruturais ou funcionais, é fundamental para a medida da diversidade microbiana (TORSVIK; ØVREÅS, 2002; FIERER; LENNON, 2011; CORDERO; POLZ, 2014).

A diversidade pode ser quantificada por intermédio de índices matemáticos, que levam em consideração informações taxonômicas na definição das unidades de medida (táxons) (ZILLI et al., 2003; LEMOS et al., 2011). Um índice de diversidade é um valor único; assim, não pode indicar a composição total de uma comunidade. Por exemplo, duas comunidades podem ter o mesmo valor de índice de diversidade, mas uma pode compreender baixa uniformidade e alta riqueza, e a outra pode compreender alta uniformidade e baixa riqueza. Nesse sentido, tanto a uniformidade como a riqueza de espécies precisam ser consideradas nas avaliações de diversidade (KENNEDY, 1999; HAEGEMAN et al., 2013).

A diversidade microbiana pode ser expressa de diversas maneiras: como grupos taxonômicos ou como números individuais (índices de diversidade), que são baseados no número de táxons ou OTUs (*operational taxonomic units* - unidades taxonômicas operacionais), bem como também pode ser representada na forma de árvores filogenéticas, ou estimada a partir do número de associações funcionais (TORSVIK; ØVREÅS, 2008). Na Tabela 1 são apresentadas algumas expressões utilizadas para descrever os diferentes níveis de diversidade microbiana, aplicados para melhor compreensão das relações desses níveis específicos de diversidade com o funcionamento e a sustentabilidade de ecossistemas (ØVREÅS, 2000).

Tabela 1. Algumas definições utilizadas para a descrição da diversidade microbiana

EXPRESSÃO	DEFINIÇÃO
Diversidade de espécies	Refere-se ao número de diferentes espécies em um determinado habitat ou bioma.
Diversidade genética	Variedade de genes dentro de uma espécie.
Redundância funcional	Capacidade de algumas espécies microbianas para desempenhar processos equivalentes num ecossistema.
Diversidade funcional	O número de processos biológicos, funções ou características de um ecossistema particular.
Diversidade trófica	Número de níveis tróficos presentes num ecossistema. É um indicador da complexidade da cadeia alimentar.
Diversidade estrutural	Número de partes ou elementos dentro de um sistema, indicado por medidas como o número de espécies, genes, comunidades ou ecossistemas.
Diversidade de habitats	Variabilidade entre os habitats em uma paisagem ou região.

Fonte: DENG, 2012

2.5 BIODIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

O solo é um hábitat dinâmico, complexo e altamente heterogêneo que abriga um grande número de organismos (GARBEVA et al., 2004). Ele regula a produtividade das plantas, dos ecossistemas terrestres e exerce controle sobre a ciclagem biogeoquímica dos elementos (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013). Os diferentes componentes das frações sólidas no solo (areia, silte, argila e matéria orgânica), fornecem uma infinidade de diferentes microhabitats “hot spots”, dentro dos quais existe uma diversidade de nichos que permitem sustentar as diversas populações microbianas (GARBEVA et al., 2004; ROESCH et al., 2007).

Os microrganismos do solo representam os componentes sólidos vivos mais importantes deste ecossistema, atuando diretamente sobre a composição físico-química do solo e, portanto, melhorando o crescimento das plantas. Eles são fundamentais para a manutenção das funções dos solos tanto naturais quanto agrícolas, devido ao seu envolvimento na formação da estrutura do solo, decomposição da matéria orgânica, degradação de xenobióticos e ciclos biogeoquímicos (VAN ELSAS, et al., 1997; ; NIELSEN et al., 2011). Além disso, os microrganismos desempenham papéis fundamentais na supressão de doenças, controle de patógenos, produção de diferentes hormônios e enzimas, assim como na promoção do crescimento vegetal (DORAN et al., 1996; BASHAN; HOLGUIN, 1998; SCHNITZER et al., 2011).

Existe uma ampla variedade de microrganismos no solo com efeitos benéficos, neutros ou patogênicos (MIRANSARI, 2013), cuja densidade populacional é influenciada por uma rede interligada de fatores de seleção que diferem entre os ecossistemas, tornando cada ecossistema único em relação a sua comunidade microbiana (BALSER et al., 2010). Esses fatores incluem as características físico-químicas do solo como pH, textura, nutrientes e teor de matéria orgânica, assim como características edáficas e climáticas específicas de cada ambiente (MARSCHNER et al., 2004; TRABELSI; MHAMDI, 2013; CHAPARRO et al., 2012).

Entre os diferentes ambientes da Terra, o solo é conhecido por abrigar as mais abundantes e diversas populações bacterianas (ROESCH et al., 2007; GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013) constituídas, principalmente, por representantes dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*, sendo que os dois primeiros domínios representam a maior parte dessa biota (JANSEN, 2006). Estima-se que

aproximadamente 10^9 células bacterianas estão contidas em um grama de solo (GANS et al., 2005; RAYNAUD; NUNAN, 2014), compreendendo até 10^6 espécies diferentes (ROESCH et al., 2007; HIRSCH et al., 2010; BURNS et al., 2013), e que ao redor de 80-90% dos processos que ocorrem no solo são reações mediadas por esses microrganismos (NANNIPIERI et al., 2003).

Entretanto, apenas uma pequena porcentagem dos microrganismos do solo (cerca de 1% do número total de células observado pela contagem direta), pode ser cultivada em laboratório. Aquelas que são incapazes de crescer em meios de cultura pertencem a grupos para os quais, as condições ideais de cultivo ainda não foram definidas e/ou dependem de outros microrganismos para o seu crescimento (HIRSCH et al., 2010). Contudo, métodos dependentes e independentes de cultivo, têm permitido obter uma melhor compreensão da composição geral das comunidades bacterianas do solo, representadas principalmente por microrganismos dos filos *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (JANSSEN, 2006; ZHANG; XU, 2008; EAST, 2013; LAKSHMANAN et al. 2014).

Dessa forma, o estudo da biodiversidade microbiana é necessário para entender a função dos microrganismos nos seus habitats específicos (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013), podendo levar ao desenvolvimento de técnicas, processos e/ou produtos ambientalmente corretos que possam melhorar a atividade biológica do solo, aumentando assim, a produtividade das culturas e a recuperação de áreas degradadas pela atividade humana (BAKKER et al., 2015).

2.6 RIZOSFERA E INTERAÇÕES PLANTA-MICRORGANISMOS

As interações planta-microrganismo podem ocorrer na filosfera, endosfera e rizosfera. O ambiente filosfera está relacionado com as partes aéreas das plantas e a endosfera está relacionada com o sistema interno de transporte (BHATTACHARYYA, 2012). Já o termo rizosfera pode ser definido como a zona ao redor da raiz, onde microrganismos e importantes processos para o crescimento e a saúde das plantas estão localizados (HARTMANN et al., 2008, BAKKER et al., 2013).

De acordo com Bringhurst et al. (2001) a rizosfera inclui a região do solo que sofre influência do metabolismo radicular das plantas, frequentemente se

estendendo a alguns milímetros desde a superfície da raiz. Alguns autores têm subdividido a rizosfera em três áreas: endorizosfera, que compreende o tecido da raiz, incluindo a endoderme e as camadas corticais; rizoplano, que consiste na superfície da raiz onde as partículas de solo e os microrganismos se aderem; e ectorizosfera, que consiste no solo imediatamente adjacente à raiz (CAMPBELL; GREAVES, 1990; PRASHAR et al., 2014).

A rizosfera representa um dos mais diversos habitats no planeta (TRABELSI; MHAMDI, 2013), sendo considerada uma região única e dinâmica que difere do restante do solo. As diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas do solo rizosférico, em comparação com solos não rizosféricos, são responsáveis pelas alterações na diversidade microbiana e pelo aumento do número e da atividade de microrganismos nesse ambiente (KENNEDY, 1998; SINGH et al., 2011).

Existem várias interações entre os microrganismos da rizosfera e as plantas que estão intimamente relacionadas com a liberação ou rizodeposição de compostos pelas raízes que favorecem a manutenção de elevadas populações microbianas neste habitat (YEVDOKIMOV, 2013). Este efeito do metabolismo vegetal sobre o solo e microrganismos vizinhos às raízes é denominado de efeito rizosfera (BERENDSEN et al., 2012), e pode ser quantificado pela determinação da relação entre o número de microrganismos na rizosfera (R) pelo número de microrganismos no solo não rizosférico (S), definido como a relação rizosfera-solo (R/S) (ANEJA, 2003). Em geral, essa relação R/S resulta em valores normalmente maiores que 1, indicando uma alta atividade microbiana na rizosfera (Tabela 2), mas pode apresentar variações em função dos grupos microbianos considerados, espécies vegetais, dentre outros (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007).

Geralmente, devido à maior disponibilidade de nutrientes na rizosfera em relação ao solo não rizosférico, e à capacidade das bactérias em utilizar os exsudatos liberados pelas plantas como substrato para seu metabolismo, as populações bacterianas encontradas na rizosfera são geralmente maiores quando comparadas a outros grupos microbianos do solo, tais como fungos, actinomicetos, protozoários ou algas (PRASHAR et al., 2014).

Tabela 2. Composição microbiana presente na rizosfera de trigo e em solo não rizosférico, e magnitude do efeito rizosfera sobre cada grupo filogenético.

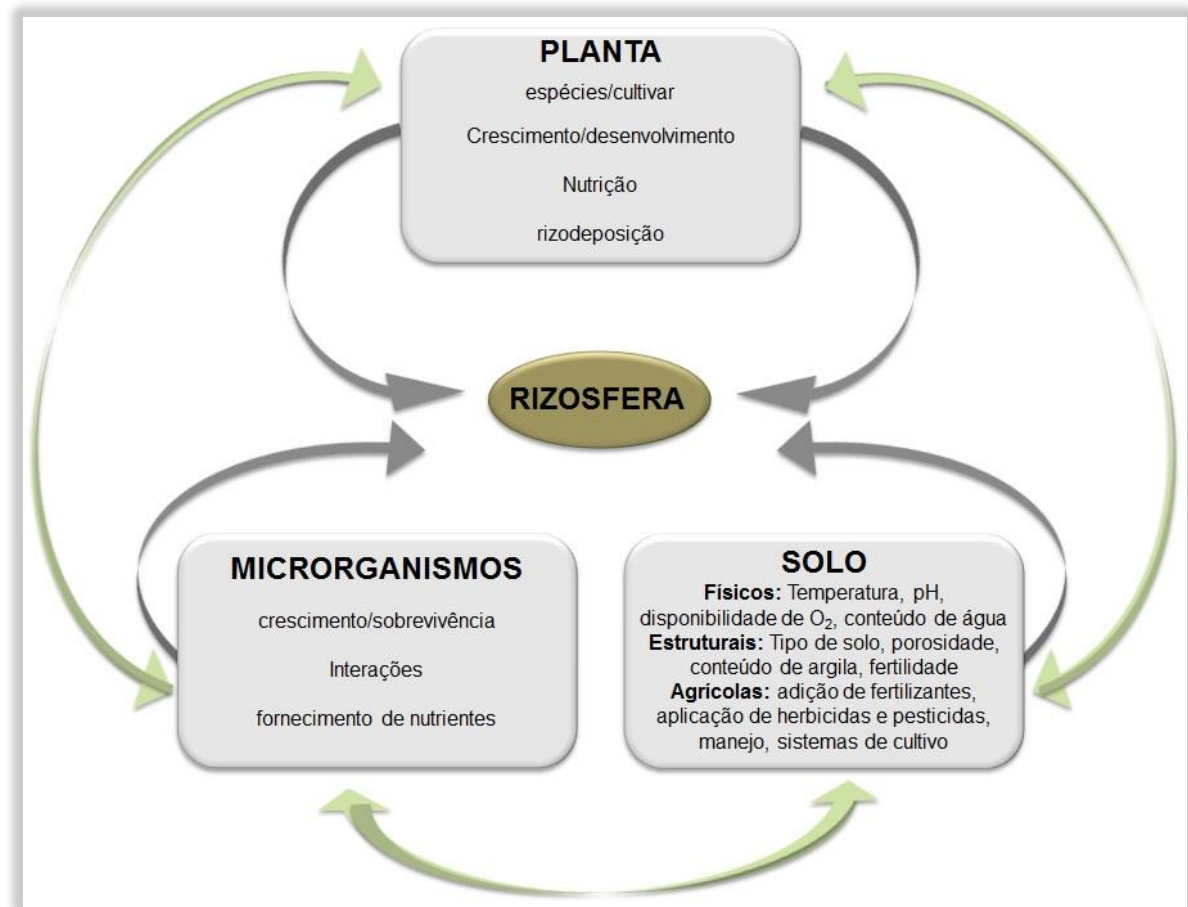
Microrganismos	Rizosfera (R)	Solo não Rizosférico (S)	Relação R/S (Efeito Rizosfera)
	UFC g ⁻¹	UFC g ⁻¹	
Bactérias	1,2 x10 ⁹	5,3 x10 ⁷	22,6
Fungos	1,2 x10 ⁶	1,0 x10 ⁵	12
Actinomicetos	4,6 x10 ⁷	7,0 x10 ⁶	6,6
Protozoários	2,4 x10 ³	1,0 x10 ³	2,4
Algas	5,0 x10 ³	2,7 x10 ⁴	0,2
Amonificantes	5,0 x10 ⁸	4,0 x10 ⁶	125,0
Desnitrificantes	1,3 x10 ⁸	1,0 x10 ⁵	1300,0

Fonte: Adaptado de DOTANIYA; MEENA, 2014.

Um dos principais aspectos considerados no estudo da dinâmica das populações microbianas da rizosfera é a influência que exercem sobre as plantas (LYNCH, 1990). O crescimento das plantas é fortemente influenciado pelos processos que ocorrem na rizosfera e que afetam a microbiota componente deste habitat. Esses processos incluem a absorção de água e nutrientes pela raiz (PHILIPOT et al., 2013), as rizodeposições tais como a exsudação de compostos de baixo peso molecular (exsudados radiculares), emissão de etileno, dióxido de carbono e outros gases, e a síntese de mucilagens (misturas de polissacarídeos de alto peso molecular) na superfície da raiz (YEVDOKIMOV, 2013), bem como as relações ecológicas decorrentes das interações entre os componentes da comunidade microbiana do solo (RYAN et al., 2008).

Além disso, muitos desses processos estão interligados e a magnitude do efeito rizosfera é determinada pela interação de diferentes fatores no sistema planta-solo-microrganismo, conforme ilustrado na Figura 4 (BRIMECOMBE et al., 2007). Por meio da rizodeposição, as plantas fornecem substratos que contribuem para o crescimento populacional dos microrganismos do solo. Estes microrganismos, por sua vez, promovem a decomposição da matéria orgânica liberando compostos assimiláveis pelas plantas, interagem com outros microrganismos presentes no solo exercendo influência sobre a estrutura geral da comunidade microbiana, modificam algumas características dos solos, e influenciam o desenvolvimento e saúde das plantas (CHAPARRO et al., 2014; BERENDSEN et al., 2012; MENDES et al., 2013).

Figura 4. Fatores que influenciam as interações na rizosfera



Fonte: Adaptado de BRIMECOMBE et al., 2007

Diferentes tipos de interações planta-microrganismo acontecem na rizosfera e envolvem a colonização microbiana em torno das raízes como resultado de relações associativas, simbióticas, neutralistas ou parasitárias. Tais interações dependem de fatores como o nível de nutrientes no solo, o ambiente do solo em geral, o mecanismo de defesa da planta e a proliferação do próprio microrganismo (PARMAR; DUFRESNE, 2011). No entanto, tem sido verificado que os microrganismos utilizam os mesmos mecanismos, em combinações diferentes e para fins diferentes, na sua interação com as plantas, sejam eles benéficos ou patogênicos (LUGTENBERG et al., 2002).

É provável que a busca de nutrientes pelos microrganismos seja o princípio por trás da colonização da rizosfera, já que para o estabelecimento em um ambiente, as bactérias respondem a estímulos químicos de seu entorno e migram para fontes de nutrientes (WEERT; BLOEMBERG, 2006). Uma vez alcançado o ambiente de alta disponibilidade nutricional, as bactérias promovem sua colonização

pela formação de um biofilme, neste caso sobre a raiz, onde conseguem manter uma população de células por longos períodos de tempo, e dessa forma, iniciam as interações com as plantas hospedeiras (DANHORN; FUQUA, 2007). Por tanto, a manipulação da rizosfera vem sendo considerada como um mecanismo fundamental para a resolução dos problemas críticos que o planeta enfrenta, incluindo a sustentabilidade agrícola e florestal, o melhoramento da qualidade da água, a mitigação das mudanças climáticas e a preservação da biodiversidade (TRABELSI; MHAMDI, 2013).

2.7 BIODIVERSIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA

Como descrito anteriormente, a rizosfera conta com elevadas concentrações de fontes de carbono facilmente degradáveis, em razão da grande quantidade de nutrientes secretados e liberados pelas raízes, como lisados e exsudatos radiculares. Isso faz com que nessa região do solo, a taxa de atividade microbiana possa ser até 50 vezes maior do que no solo livre do crescimento vegetal (PRASHAR et al., 2014).

A diversidade microbiana na rizosfera inclui várias espécies de bactérias, arqueobactérias, fungos, oomicetos e vírus (PHILIPOT et al., 2013). Contudo, pelo fato das bactérias serem os microrganismos mais abundantes na rizosfera, estima-se que até 15% da superfície da raiz possa estar coberta por microcolônias bacterianas, compreendendo uma grande variedade de espécies (VAN LOON, 2007). Estimativas recentes apontam que a rizosfera pode conter até 10^{11} células microbianas por grama de raiz, e mais de 30.000 espécies procarióticas diferentes (BERENDSEN et al., 2012), que além de utilizar os nutrientes liberados a partir do hospedeiro para o seu crescimento, também secretam metabólitos na rizosfera (YEVDOKIMOV, 2013).

A diversidade bacteriana na rizosfera está representada principalmente por espécies pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* (COSTA et al., 2006; MENDES et al., 2011; BERENDSEN et al., 2012). Estudos sugerem que ocorre um crescimento seletivo de grupos específicos de bactérias na rizosfera, em razão do padrão quali-quantitativo de exsudatos e rizodepósitos ao longo da raiz (DEANGELIS et al., 2009). De fato, o número de microrganismos perto

do ápice radicular é geralmente mais elevado do que em outros locais ao longo da raiz (SEMENOV et al., 1999).

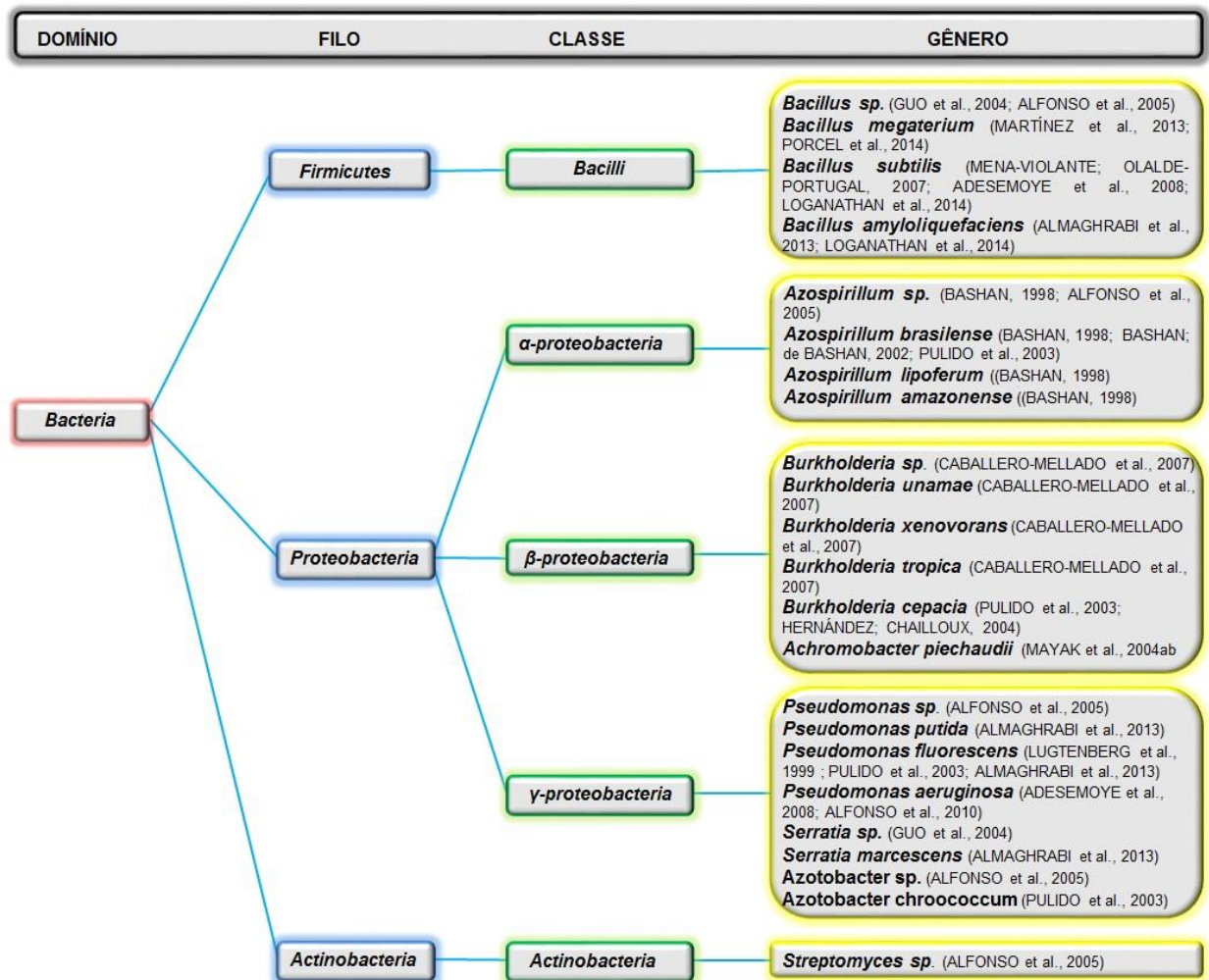
Por outro lado, devido à grande diversidade da microbiota do solo e da rizosfera, os métodos tradicionais de isolamento e cultivo são limitados, pois poucos microrganismos são cultiváveis. Nesse sentido, grandes avanços na ecologia microbiana da rizosfera ocorreram por meio da construção de bibliotecas metagenômicas, fornecendo análises dos microrganismos não cultiváveis (HIRSCH et al., 2010). Os gêneros mais comuns de bactérias que têm sido relatados na rizosfera são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Flavobacter*, *Cellulomonas* e *Micrococcus*, dos quais, microrganismos de crescimento rápido r-estrategistas como espécies de *Pseudomonas* e *Burkholderia* são as mais abundantes, devido à maior capacidade para utilizar a ampla gama de exsudatos de carbono liberados pelas raízes (BUÉE et al., 2009; PRASHAR et al., 2014).

Hawkes et al. (2007), em um estudo de meta-análise feito a partir da rizosfera de 14 espécies de plantas (nove dicotiledôneas herbáceas, duas dicotiledôneas lenhosas, e três gramíneas), encontraram que os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* foram bem representados, como foi previsto com base em análises dependentes de cultivo e nas suposições de taxas de crescimento rápido para estes filos. No entanto, também foram revelados um grande número de outros filos e mais de 1200 táxons bacterianos distribuídos em 35 ordens taxonômicas diferentes, sugerindo que a composição das comunidades microbianas na rizosfera pode ser mais complexa do que a simples resposta dos microrganismos à quantidade e qualidade de compostos de carbono exsudados pelas raízes.

2.8 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) foram descritas por Kloepper e Schroth (1978) como um grupo benéfico e heterogêneo de microrganismos do solo que apresentam capacidade de colonizar as plantas e promover o seu crescimento (Figura 5). Este grupo microbiano pode ser encontrado colonizando a rizosfera, a superfície das raízes (rizoplano), o filoplano ou em ambientes endofíticos (AHMAD et al., 2008), e promovem o crescimento das plantas direta ou indiretamente (GLICK, 1995).

Figura 5. Bactérias promotoras do crescimento vegetal mais estudadas em plantas de tomate, agrupadas de acordo com sua classificação filogenética



Fonte: A autora, 2015

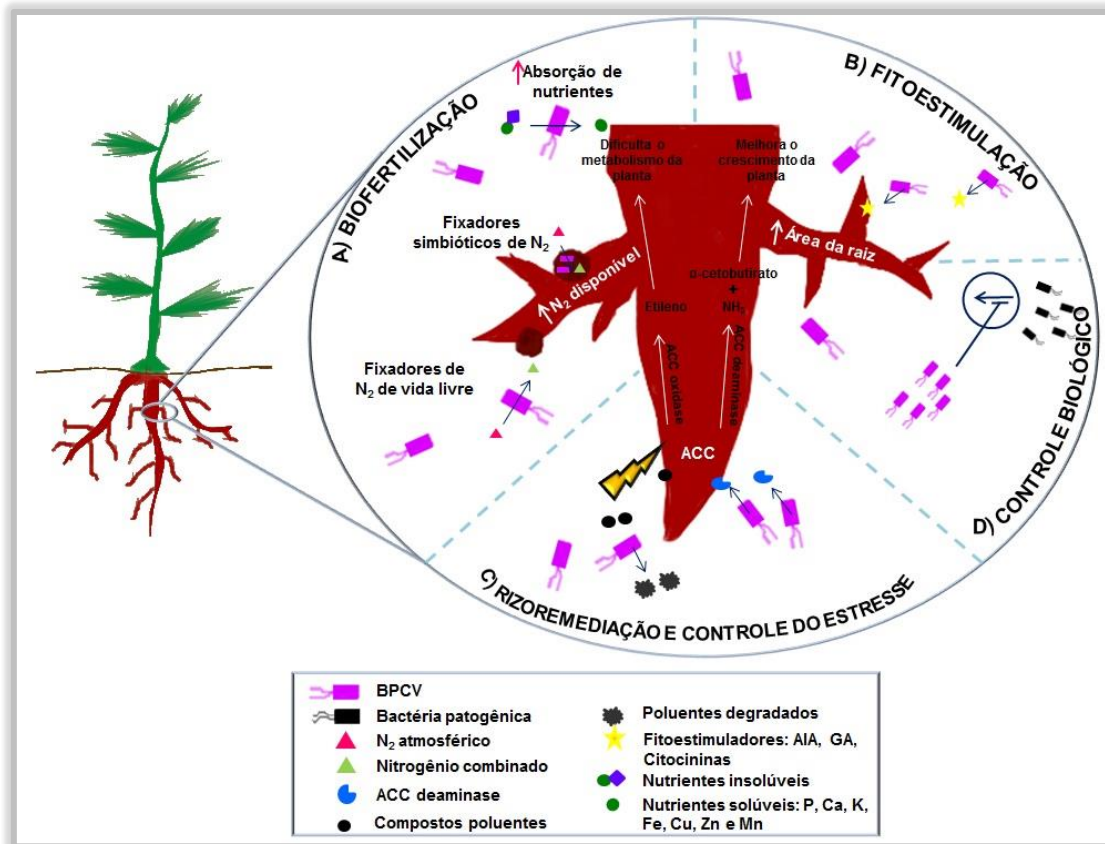
A promoção do crescimento por mecanismos diretos ocorre quando as BPCV afetam o metabolismo das plantas, fornecendo nutrientes que geralmente são escassos, por meio de processos como a fixação do nitrogênio atmosférico (BODDEY; DOBBEREINER, 1988; BALDOCK; BALLARD, 2004), solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999, RODRIGUEZ et al., 2004), produção de hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno (ZAHIR et al., 2004; GAMALERO; GLICK, 2011). Esses processos podem ajudar a planta a aumentar a absorção de água e sais minerais, incrementar a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de nutrientes (como o nitrogênio), e melhorar o desenvolvimento radicular (BASHAN; HOLGUIN, 1998).

A promoção indireta ocorre quando BPCV (também chamadas por Bashan e Holguin (1998), de BPCV de controle biológico), promovem o crescimento das plantas ao produzirem uma ampla variedade de substâncias que podem diminuir ou suprimir os efeitos deletérios de um ou mais microrganismos fitopatogênicos (GLICK, 1995; BASHAN; HOLGUIN, 1998). Entre os mecanismos de promoção indireta, encontra-se a competição direta com fitopatógenos, indução da resistência sistêmica na planta, a produção de substâncias como sideróforos, antibióticos, ácido cianídrico (HCN), quitinase, β -1,3-glucanase, entre outros (KLOEPPER et al., 1989; CATTELAN, 1999; ZAHIR et al., 2004; BASHAN et al., 2007). Além disso, algumas BPCV podem melhorar a tolerância da planta contra estresses abióticos, como a seca, a alta salinidade e a toxicidade de metais (YANG et al., 2009).

Além desta classificação, dois novos termos foram introduzidos por Gray e Smith (2005) para agrupar as BPCV em relação aos espaços da planta que elas ocupam: BPCV intracelulares, localizadas no interior das células das raízes, geralmente em estruturas especializadas como os nódulos, e BPCV extracelulares, que de acordo com o grau de associação com as raízes das plantas, estão situadas na rizosfera, na superfície da raiz ou nos espaços intercelulares do córtex da raiz.

Com base no objetivo da sua aplicação e nos efeitos favoráveis que exercem sobre as plantas, Lugtenberg et al. (2002) classificaram as BPCV como biofertilizantes (aumentando a disponibilidade de nutrientes para as plantas), fitoestimuladores (promovendo o crescimento da planta, usualmente pela produção de fitohormônios), rizoremediadores (degradando poluentes orgânicos que usam exsudatos da raiz como fonte de carbono) e agentes de controle biológico ou biopesticidas (controlando doenças, principalmente pela produção de antibióticos e metabólitos antifúngicos) (Figura 6) (SOMERS et al., 2004; ANTOUN; PRÉVOST, 2005).

Figura 6. Algumas formas de promoção do crescimento vegetal



Fonte: Adaptado de PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014

2.8.1 Principais Mecanismos de Ação das BPCV

2.8.1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é um dos principais nutrientes da planta e a sua baixa disponibilidade devido às elevadas perdas por lixiviação ou volatilização é um fator limitante nos sistemas agrícolas. Embora o N_2 molecular encontra-se na atmosfera numa concentração de quase 80%, ele não está disponível para a maioria dos organismos vivos já que é uma molécula muito estável quimicamente. Nesse sentido, ele deve ser reduzido a NH_4^+ antes que possa ser assimilado (FISHER; NEWTON, 2002). Portanto, as bactérias com capacidade de fazer com que o N atmosférico esteja disponível para as plantas desempenham um papel importante e são denominadas diazotróficas (VIVEROS et al., 2010).

Existem dois tipos de fixação biológica de nitrogênio: simbiótica e assimbiótica (REED et al., 2011). A primeira refere-se ao processo em que o

microrganismo fixa o nitrogênio, enquanto cresce em associação com a planta hospedeira formando estruturas nodulares bem definidas (DOBEREINER, 1997; FAGERIA, 1998), mas limita-se a espécies de plantas leguminosas e algumas árvores e arbustos que formam nódulos actinorrízicos com *Frankia*. Entre as bactérias simbióticas mais estudadas encontram-se *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (ZAHARAN, 2001). A fixação assimbiótica é realizada por bactérias diazotróficas que podem ser associativas aos vegetais ou por diazotrofos de vida livre. Os diazotrofos associativos podem colonizar tanto a rizosfera como o interior de tecidos vegetais sem causar danos as plantas, neste último caso sendo considerados diazotrofos endofíticos. As bactérias diazotróficas de vida livre são capazes de sobreviver no solo ou colonizar as plantas desde que o ambiente esteja propício para a sua multiplicação celular (EVANS; BURRIS, 1992; BALDANI et al., 1997; REIS et al., 2006).

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) resulta em um alto custo metabólico para os microrganismos envolvidos, já que esse processo depende da atividade do sistema enzimático nitrogenase que hidrolisa 16 moléculas de ATP para cada N_2 fixado como NH_4^+ (RAYMOND et al., 2004). Apesar do alto custo energético, a FBN contribui mundialmente com 180×10^6 ton ano⁻¹ de nitrogênio assimilável no planeta, dos quais 80% são resultantes das associações simbióticas e o restante resulta dos sistemas associativos e de vida livre (SAHARAN; NEHRA, 2011; FOWLER et al., 2013).

2.8.1.2 Solubilização de Fosfatos

O fósforo é o segundo macronutriente em importância para o crescimento das plantas. Mesmo em solos ricos em fósforo, a maior parte dele (75-90%) encontra-se na forma de fosfatos de alumínio e ferro (em solos ácidos) e fosfato de cálcio (em solos alcalinos) que se fixam no solo, tornando-o indisponível para as plantas (STEVENSON; COLE, 1999; MULLEN, 2005; YANG et al., 2013). Desta forma, cerca de 3/4 dos fertilizantes fosfatados aplicados ao solo precipitam em formas insolúveis, aumentando assim, o requerimento das culturas por este nutriente (GOLDSTEIN, 1986; SHEN et al., 2011). Em adição, a mobilização deste nutriente a partir de minerais é um processo lento e a quantidade mobilizada

geralmente é insuficiente para suprir as necessidades de um cultivo agrícola (SCHNEIDER et al., 2010; LYNCH 2011; DODD et al., 2013; TURNER et al., 2013).

Bactérias solubilizadoras de Fosfatos (BSF) têm um papel essencial no ciclo do P na natureza, atuando na solubilização de fosfatos inorgânicos ou na mineralização do fosfatos orgânicos (RICHARDSON et al., 2011), através da síntese de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (tais como ácidos cítrico e glucônico) e fosfatases que se ligam aos fosfatos no solo, resultando na liberação de fosfato solúvel na forma dos ânions H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} (GYANESHWAR et al., 2002; GAMALERO; GLICK, 2011).

Considerando que a disponibilidade de P é uma etapa limitante para a nutrição da planta, a capacidade em solubilizar fosfato inorgânico por bactérias associativas representa um grande potencial para a promoção do crescimento vegetal. Entre as bactérias com esta capacidade estão os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

2.8.1.3 Produção de Sideróforos

O ferro é um micronutriente essencial das plantas, uma vez que serve como cofator de muitas enzimas com atividade redox (PODILE; KISHORE, 2006; BEASLEY; HEINRICHS, 2010). Embora a quantidade deste elemento seja elevada na maioria dos solos, sua disponibilidade é geralmente muito baixa, como resultado da pequena solubilidade dos óxidos de ferro. As plantas e os microorganismos do solo possuem diferentes estratégias aplicadas à absorção do ferro, incluindo a liberação de moléculas orgânicas e metabólitos capazes de formar complexos com Fe^{+3} (LEMANCEAU et al., 2009).

De maneira comparativa, os microorganismos são mais eficientes na absorção de ferro em comparação com as raízes das plantas (COLOMBO et al., 2014). Enquanto as dicotiledôneas podem exsudar ácidos orgânicos e promover a acidificação da rizosfera em resposta à deficiência de ferro e fósforo, algumas monocotiledôneas (família *Poaceae*) e microorganismos do solo respondem à condição de deficiência em ferro pela produção de moléculas quelantes específicas ao ferro (fitosideróforos e sideróforos, respectivamente), resultando em aumento da

disponibilidade deste elemento na superfície celular (MARSCHNER et al., 2011; MIMMO et al., 2014).

Na rizosfera, a demanda mútua por ferro e fósforo resulta em uma forte competição entre as plantas e os microrganismos do solo, onde os microrganismos possuem aparente vantagem pela capacidade em decompor fitosideróforos e a sua proximidade à superfície da raiz; no entanto a ação microbiana é fortemente afetada pela disponibilidade de carbono que é controlada pelos vegetais, como resultado da quantidade e composição dos exsudatos liberados pela rizosfera (MARSCHNER et al., 2011). Os sideróforos são peptídeos de baixo peso molecular, de natureza estruturalmente diversa, sendo excretados sob condições de deficiência de ferro para sequestrar este elemento do ambiente externo ou de outros organismos (AHMED; HOLMSTRÖM, 2014). Algumas BPCV como *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Enterobacter* produzem uma ampla faixa de compostos quelantes de ferro e podem auxiliar o crescimento da planta, aumentando a disponibilidade de ferro próximo à raiz ou inibindo a colonização de raízes de plantas por organismos patogênicos (NEILANDS, 1995; ZAHIR et al., 2004; LOACES et al., 2011).

2.8.1.4 Produção de Fitormônios

Fitormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico, desempenham um papel chave na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando como mensageiros químicos capazes de influenciar os processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos das plantas, em concentrações extremamente baixas (FUENTES-RAMIREZ; CABALLERO-MELLADO, 2005; GAMALERO; GLICK, 2011).

O Ácido-3-Indol Acético (AIA) é uma auxina conhecida por estar envolvida na iniciação da raiz, a divisão celular, e alongamento das células (SALISBURY, 1994; EGAMBERDIEVA, 2009), resultando no aumento da área superficial da raiz, que permite à planta ter um maior acesso aos nutrientes do solo. Vários experimentos realizados com estirpes de *Azospirillum* mostraram que a produção de AIA e outros fitormônios por este gênero é um dos fatores responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento de plantas em diferentes solos e condições climatológicas (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; CASSÁN et al., 2014).

O etileno desempenha um papel importante na germinação por quebra de dormência de sementes; no entanto, uma elevada concentração de etileno inibe o alongamento das raízes e pode produzir senescência prematura (GLICK et al., 1999; BASHAN; DE BASHAN, 2010). Em diferentes tipos de estresse, como geadas, inundações, infecções com patógenos, presença de metais pesados, entre outros, as plantas respondem sintetizando ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) que é o precursor para o etileno (CHEN et al., 2002; GLICK et al., 2007). O mecanismo apresentado pelas BPCV envolvendo o etileno reside na degradação do ACC pela síntese da enzima ACC desaminase, prevenindo os efeitos nocivos dos altos níveis de etileno sobre o desenvolvimento da planta quando esta se encontra em condições adversas ao seu crescimento (GLICK et al., 1998). Algumas BPCV identificadas por produzirem fitormônios pertencem aos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (ZAHIR et al., 2004).

2.8.1.5 Controle Biológico

Patógenos de solo são bem conhecidos por seus efeitos devastadores sobre a sanidade e produtividade das plantas. Para um controle satisfatório das doenças, é importante encontrar formas mais eficazes e econômicas para proteger a planta. Neste contexto, BPCV que possam fornecer o biocontrole de pragas e doenças são consideradas uma alternativa aos pesticidas químicos (ZAHIR et al., 2004; BENEDUZI et al., 2012).

Vários mecanismos estão envolvidos no controle biológico e podem envolver o antagonismo direto via produção de antibióticos, sideróforos, HCN, enzimas hidrolíticas (quitinases, proteases, lipases), ou mecanismos indiretos nos quais as BPCV competem diretamente com o patógeno por locais de colonização e nutrientes (MARTINEZ-VIVEROS et al., 2010). O biocontrole também pode ser mediado pela ativação da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e pela modificação dos níveis hormonais (BOWEN; ROVIRA, 1999; VAN LOON, 2007).

2.8.2 Gêneros de BPCV

Nas últimas décadas foram relatadas uma grande variedade de espécies de bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Frankia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Xanthomonas* entre outras, com a capacidade de exercer efeitos benéficos e promover o crescimento das plantas (KLOEPPER et al., 1989; GLICK, 1995; BASHAN; de BASHAN, 2005; AHMAD, 2008).

2.8.2.1 *Pseudomonas*

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são bactérias gram-negativas em forma de bastonete e pertencem à classe γ -proteobactérias. O papel de algumas espécies de *Pseudomonas* na agricultura tem sido um assunto de interesse devido ao seu potencial para suprimir patógenos e aumentar o crescimento das plantas, uma vez que, muitas delas, têm a capacidade de produzir uma variedade de metabólitos como antibióticos, sideróforos, fosfatases, fitormônios, entre outros (REDDY, 2014). Um grande número de espécies podem produzir exopolissacarídeos que facilitam a formação de biofilmes (DANHORN; FUQUA, 2007). Atualmente o gênero possui 228 espécies descritas (<http://www.bacterio.net>).

Ramamoorthy et al. (2002) avaliaram a capacidade de 20 isolados de *Pseudomonas* para o controle do tombamento de tomate e pimenta, causado pelo fungo *Pythium aphanidermatum*. Eles encontraram que a cepa *P. fluorescens* Pf1 mostrou a maior inibição do crescimento micelial e uma melhor eficiência na redução do tombamento em tomate e pimenta, assim como um aumento na promoção do crescimento dessas plantas. Similarmente, Sangeetha et al. (2010) encontraram que uma mistura de *Pseudomonas* (NFP6), *P. fluorescens* (Pf3a) e *B. subtilis* (BS1) aumentaram a indução de enzimas de defesa da bananeira contra a podridão-da-coroa causada por *Lasiodiplodia theobromae* e *Colletotrichum musae* em condições *in vivo*.

2.8.2.2 *Bacillus*

Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas e podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias. Até hoje existem 312 espécies descritas (<http://www.bacterio.net>), sendo que vários representantes deste gênero são capazes de colonizar plantas e desenvolver ações benéficas sobre o crescimento e saúde das plantas (BORRISS, 2015). Atualmente, as bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas no mercado de biopesticidas e inoculantes. Isto é principalmente devido à sua capacidade para produzir endósporos, que aumentam a sua resistência contra fatores adversos e permitem a preparação de bioformulações estáveis com prazos de validade longos, além da facilidade de aplicação e maior tempo de permanência no solo (BORRISS, 2011).

Nos últimos anos, tem sido demonstrada a eficiência de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* e *B. mycoides* na promoção do crescimento vegetal e no biocontrole contra patógenos de plantas principalmente espécies dos gêneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* e *Verticillium* (KREBS et al., 1998; GUTIERREZ-MAÑERO et al., 2001; RAMIREZ; KLOEPPER, 2010; REDDY, 2014).

O efeito da inoculação de plantas de chá (*Camellia sinensis*) com *B. megateirum*, foi examinado por Chakraborty et al. (2006), observando a capacidade dessa bactéria de solubilizar fosfatos, produzir AIA, sideróforos, e metabólitos que reduzem os efeitos deletérios causados pelo fungo *Fomes lamaoensis*. Similarmente, a estirpe *Bacillus* sp. BPR7 isolada da rizosfera de feijão por Kumar et al. (2012), também mostrou grande potencial como inoculante ao produzir, *in vitro*, diversos metabólitos e solubilizar diferentes fontes de fosfato orgânico e inorgânico assim como potássio e zinco, além do forte efeito antagonista contra vários fungos fitopatogênicos.

2.8.2.3 *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* está constituído por microrganismos procariotos situados na subdivisão α -Proteobacteria, no qual se encontram a maioria das bactérias gram-negativas formato vibrio e/ou espirilo (MOREIRA et al., 2010). São bactérias diazotróficas endofíticas que colonizam a superfície e o interior das raízes,

principalmente de plantas monocotiledôneas, incluindo o milho, arroz, cana de açúcar, sorgo e gramíneas forrageiras (VIDEIRA et al., 2007) sendo este tipo de associação considerada o ponto de partida da FBN com plantas não leguminosas em todo o mundo. (BALDANI et al., 1997). O gênero atualmente possui 17 espécies descritas (<http://www.bacterio.net>).

Entre as BPCV, *Azospirillum* é um dos gêneros de bactérias que nunca foi reportado como patogênico para qualquer organismo vivo, e devido aos seus efeitos benéficos tem sido utilizado como inoculante para várias culturas (MEHNAZ 2015). As características pelas quais este gênero é conhecido são a sua capacidade para realizar a fixação biológica do nitrogênio, produzir fitormônios, solubilizar fosfatos e produzir sideróforos. Embora estudos sobre antagonismo tenham sido realizados, os resultados não fornecem provas conclusivas para considerar *Azospirillum* como um verdadeiro agente de controle biológico (BASHAN; DE BASHAN, 2010).

2.8.2.4 *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* pertence à classe β -proteobactéria. São bactérias gram-negativas em forma de bastonetes móveis e inicialmente foram isoladas das raízes e colmos de plantas de arroz. Este gênero também tem sido estudado quanto a sua capacidade de degradação de poluentes, devido a sua grande diversidade de utilização de fontes de carbono. Atualmente o gênero *Burkholderia* abrange 98 espécies válidas (<http://www.bacterio.net>), com grande diversidade funcional. Somente oito espécies são consideradas como fixadoras de nitrogênio: *B. vietnamiensis*, *B. terrae*, *B. xenovorans*, *B. ginsengisoli*, *B. unamae*, *B. tropica*, *B. silvatlantica* e *B. heleaia* (VIDEIRA et al., 2007; MOREIRA et al., 2010).

Bactérias do gênero *Burkholderia* são provavelmente os mais diversos e adaptáveis microrganismos associados às plantas (COMPANT et al. 2008). Porém, esse gênero é conhecido por incluir espécies patogênicas que pertencem ao complexo *Burkholderia cepacia* envolvidas em infecções humanas (ANGUS et al. 2014). Contudo, ele também contém estirpes que são benéficas para as plantas e nos últimos anos têm sido encontradas em associação com diversas espécies de plantas como milho (FIORE et al. 2001; RAMETTE et al. 2005), cana de açúcar (PERIN et al. 2006; PAUNGFOO-LONHIENNE et al. 2014) e arroz (BODDEY et al. 2003; SOUZA et al. 2013).

Ao interagir com plantas de tomate expostas ao Cádmiu, uma estirpe de *Burkholderia* sp. SCMS54 levou a redução nos níveis de peróxido e clorose foliar promovido pela diminuição da absorção de Cd pela raiz, resultando no aumento da tolerância das plantas a este metal pesado altamente tóxico, e dessa forma um aumento no crescimento das plantas (DOURADO et al., 2013). Usando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, Tenório-Salgado et al. (2013) identificaram 18 compostos voláteis produzidos por *B. tropica* que estão envolvidos no mecanismo de inibição do crescimento de quatro fungos fitopatogênicos, mostrando a potencial capacidade dessa espécie como agente de controle biológico.

2.8.2.5 *Enterobacter*

O Gênero *Enterobacter* está constituído por microrganismos procariotos situados na subdivisão γ -proteobacteria, são Gram-negativos, em forma de bastonetes (HORMAECHE; EDWARDS, 1960) e compreende hoje 31 espécies descritas. Os membros deste gênero encontrassem amplamente distribuídos na natureza, sendo detectados em ambientes tais como formulas para lactantes, amostras clinicas, solos e em associação com plantas (MADHAIYAN et al., 2010).

Várias espécies do gênero *Enterobacter* têm sido descritas como capazes de promover efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas. *Enterobacter ludwigii*, por exemplo, mostrou capacidade para melhorar o desenvolvimento do sistema radicular de *Lolium perene*, assim como uma boa capacidade de solubilizar fosfato de cálcio e inibir o crescimento micelial de *Fusarium solani* (SHOEBITZ et al., 2009).

Estudos *in vitro* indicaram que células de *E. cloacae* suprimiram o tombamento de mudas de pepino causadas por *Pythium ultimum*, possivelmente influenciada pela quantidade e tipo de nutrientes exsudados durante a germinação das sementes de pepino, fazendo com que as células expressassem diferentes níveis de atividade metabólica (ROBERTS et al., 2009).

Da mesma forma, outras espécies do gênero *Enterobacter* foram referidas como promotoras do crescimento vegetal por exibir características como a produção de fitormônios, fixação de nitrogênio atmosférico e atividade de controle biológico (VASSILEVA et al., 1999; GOTZ et al., 2006).

2.8.2.6 *Rhizobium*

O gênero *Rhizobium* pertence à classe α -proteobactéria. São bactérias gram-negativas em forma de bastonetes, predominantemente aeróbias e utilizam fontes de carbono simples para o seu crescimento (KUYKENDALL et al., 2001). Atualmente são consideradas 92 espécies válidas (<http://www.bacterio.net>). Bactérias deste gênero têm a capacidade de nodular plantas leguminosas e fixar o nitrogênio atmosférico, porém, até hoje não foi relatada a atividade diazotrófica de rizóbios fora da simbiose com leguminosas, exceto sobre condições especiais (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994; LUDWIG, 1984). Essas bactérias compartilham muitas características com BPCV, como a capacidade para colonizar as raízes de plantas não-leguminosas e produzir fitormônios, sideróforos e ácido cianídrico (HCN); também podem solubilizar fosfatos orgânicos e inorgânicos e têm um bom potencial para serem usadas como agentes de controle biológico contra alguns patógenos de plantas (ANTOUN et al., 1998).

Espécies de *Rhizobium* ocorrem em solos e na rizosfera das plantas ao redor do mundo, porém, espécies únicas podem ser isoladas a partir de regiões geográficas específicas, normalmente relacionadas com a distribuição dos seus hospedeiros (MARTINEZ-ROMERO; CABALLERO-MELLADO, 1996). Entretanto, várias pesquisas tem mostrado que *Rhizobium* também pode ser encontrado endofiticamente dentro das raízes de diversas plantas. A ocorrência, por exemplo, de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e *Rhizobium oryzae* tem sido relatada nas raízes de arroz (YANNI et al., 1997; PENG et al., 2008) e estirpes de *Rhizobium etli* que normalmente formam nódulos fixadores de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* (feijão comum), é um endofítico natural em milho (GUTIERREZ-ZAMORA; MARTINEZ-ROMERO, 2001; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do efeito rizosfera de duas espécies vegetais filogeneticamente próximas, *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Solanum quitoense* (lulo), sobre a diversidade de bactérias nativas de solos com diferentes tipos de manejo; identificar os representantes da comunidade bacteriana acessada por técnicas moleculares e bioquímicas e prospectar isolados capazes de promover o crescimento vegetal.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar o isolamento de bactérias associadas ao sistema radicular de plantas de tomate e o lulo presentes em elevadas populações, e quantificar o efeito rizosfera destas espécies vegetais sobre a comunidade bacteriana nativa de solos sob diferentes tipos de manejo;
- Posicionar taxonomicamente as estirpes isoladas pelo sequenciamento do gene 16S RNAr;
- Caracterizar os isolados obtidos com relação à características relacionadas à promoção do crescimento vegetal: produção de compostos indólicos, solubilização de fosfatos insolúveis, produção de sideróforos e identificar os isolados mais promissores para o desenvolvimento de um biofertilizante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DAS RIZOBACTÉRIAS

4.1.1 Coleta das Amostras de Solo

Foram coletadas amostras de solos com diferentes tipos de manejo: mata secundária (com vegetação mista arbórea/herbácea), hortícola convencional (com cultura de abóbora) e orgânico (sem cultura no momento da amostragem, mas com histórico de cultivo de milho). As amostras foram obtidas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, UEL (23°20'S, 51°12'W), na profundidade de 0-10 cm onde sobressai o Latossolo Vermelho. Após a coleta, as amostras de solo foram expostas ao ar para secagem e posteriormente foram peneiradas e armazenadas como Terra Fina Seca ao Ar (TFSA) até o momento do uso. Uma pequena amostra de cada solo foi transportada ao Laboratório de Bioquímica da UEL para análises microbiológicas e a outra parte foi transportada até casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da UEL, sendo destinada ao cultivo das sementes de tomate (*S. lycopersicum*) e de lulo (*S. quitoense*). As análises químicas dos solos foram realizadas no laboratório de solos do Departamento de Agronomia da UEL.

4.1.2 Preparo dos microcosmos para determinação do efeito rizosfera de tomate e lulo

Para a quantificação do efeito rizosfera das duas espécies de *Solanum* utilizadas neste trabalho, foram preparados seis vasos com capacidade de 500 mL para cada um dos solos estudados, preenchidos com 1 kg de solo e a partir de então foram denominados de microcosmos. Para cada um dos solos estudados, foram utilizados três microcosmos para o plantio de tomate (Santa Adélia, Topseed) e três microcosmos para o plantio de lulo (Fercon). Estes microcosmos foram semeados com 3 sementes de cada espécie vegetal previamente desinfestadas superficialmente e foram mantidos na capacidade de campo durante todo o período de crescimento das plantas, aplicando-se sempre água destilada esterilizada. Após 15 dias da semeadura foi realizado o desbaste das plantas, mantendo-se uma planta

em cada microcosmo. No total, cada espécie vegetal foi cultivada em três tipos de solo sob diferentes manejos, com três repetições para cada tipo de solo. Após 30 dias da germinação das sementes de tomate e após 60 dias da germinação das sementes de lulo, as plantas foram coletadas e imediatamente transportadas ao laboratório de bioquímica da UEL. Após lavagem do sistema radicular das plantas com água destilada esterilizada, as raízes foram separadas com o auxílio de lâmina esterilizada sob condições assépticas, e utilizadas para o isolamento de bactérias associativas.

4.1.3 Isolamento de Microrganismos

Para o isolamento de bactérias diazotróficas a partir das raízes de tomate e de lulo, foram formadas amostras para cada microcosmo, a partir do sistema radicular de cada planta mantida na condição avaliada. Ao total foram preparadas 3 amostras para cada espécie vegetal (repetições) crescidas sob cada tipo de manejo do solo (tratamentos), resultando em 9 amostras por espécie vegetal. As raízes de cada amostra foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento sob condições assépticas e 1 g de raízes foram maceradas na presença de 9 mL de solução salina esterilizada (ANEXO 1) até a obtenção de um homogenato. Os homogenatos assim obtidos constituíram a diluição 10^{-1} (m/v) do sistema radicular das amostras, sendo seriadamente diluídos (v/v) pela transferência de 1,0 mL do homogenato para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada (diluição 10^{-2}), e consecutivamente até a obtenção da diluição 10^{-6} de cada homogenato. Somente as diluições 10^{-4} a 10^{-6} foram utilizadas para o isolamento das rizobactérias, buscando obter somente os representantes da comunidade bacteriana com capacidade de colonizar as amostras vegetais em elevadas populações.

Previamente ao isolamento das bactérias diazotróficas da rizosfera das duas espécies vegetais, foi feito o isolamento das bactérias diazotróficas nativas dos diferentes tipos de solo na ausência de plantas (solos não rizosféricos). As amostras de TFSA foram acondicionadas para estimular a atividade microbiana. Para esta finalidade, foram pesados 10 g de TFSA de cada tipo de solo e acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, com 3 repetições. Foram em seguida adicionados 2 mL de água destilada esterilizada em cada placa de modo a manter uma umidade

uniforme de 20%, seguindo uma incubação por 48 horas a 28°C de temperatura. Após o período de incubação, as amostras foram adicionadas de 90 mL de solução salina esterilizada e agitadas em rotação orbital a 180 rpm por 30 min (diluição 10^{-1} , m/v). A partir destas diluições foi realizada a diluição seriada pela transferência de 0,5 mL da diluição 10^{-1} a tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina esterilizada até a obtenção da diluição 10^{-6} . As diluições 10^{-4} a 10^{-6} foram utilizadas para o isolamento das bactérias diazotróficas.

A obtenção dos isolados representantes das comunidades diazotróficas presentes nas amostras de rizosfera e nos diferentes tipos de solo foi obtida pela inoculação de 100 μ L das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , em triplicata, em frascos contendo 5 mL de diferentes meios de cultura semi-sólidos livres de nitrogênio. Foram utilizados os meios de cultivo JMV, LGI, LGI-P, JNFb e NFb (ANEXO 2), correspondentes a diferentes condições de pH e fontes de carbono, buscando maior amplitude na comunidade diazotrófica acessada. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 28°C por um período de até 10 dias, e aqueles que apresentaram desenvolvimento de uma película na região superficial do meio foram utilizados para o isolamento de bactérias diazotróficas.

Após o crescimento, os frascos que apresentaram bactérias com crescimento positivo foram repicados para novos frascos contendo 5 mL dos respectivos meios de cultura semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio (processo repetido por duas vezes) para eliminar as bactérias sem capacidade de realizar a fixação biológica do nitrogênio. Ao final do processo de repicagem, os isolados considerados diazotróficos verdadeiros foram purificados nos respectivos meios (JMV, LGI, LGI-P, JNFb, NFb) na forma sólida. Após a purificação, os isolados foram crescidos em meio Dygs líquido (ANEXO 3) por 24h a 180 rpm e 30 °C e armazenados em glicerol a -20 °C.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

4.2.1 Extração do DNA Genômico Total

A extração do DNA genômico total foi realizada segundo o método de Cheng e Jiang (2006). Para a obtenção do DNA total das rizobactérias, as estirpes bacterianas criopreservadas foram reativadas por crescimento em meio Dygs líquido

por 24-48 horas a 28°C sob agitação orbital de 180 rpm. Após o crescimento, alíquotas de 1 mL de cada cultura foram transferidas para microtubos esterilizados e precipitadas por centrifugação por 2 min a 8000g e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 400 µL de tampão STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e homogeneizadas em vórtex. A suspensão obtida foi submetida a nova centrifugação por 2 min a 8000g e 4 °C. O precipitado foi ressuspensado em 200 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e homogeneizado em vórtex. Logo após, foram adicionados 100 µL de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e a suspensão obtida foi agitada vigorosamente no vórtex por 60 segundos. Depois disso, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 13000g e 4 °C para separar a fase aquosa da fase orgânica.

Posteriormente, foram transferidos 160 µL da fase aquosa para um microtubo esterilizado, adicionados de 40 µL do tampão TE e 100 µL de clorofórmio, sendo novamente submetidos a centrifugação por 5 min a 13000g e 4°C. Este processo foi repetido por duas a três vezes até que a presença de um precipitado na interfase não fosse observada. Em seguida, foram transferidos 160 µL do sobrenadante para um microtubo esterilizado e adicionaram-se 40 µL do tampão TE e 5 µL de RNase (10 mg mL⁻¹), seguindo uma incubação a 37 °C durante 10 min para digestão do RNA presente nas amostras. À suspensão obtida, foram adicionados 100 µL de clorofórmio seguida de nova centrifugação por 5 min a 13000g e 4 °C. Finalmente, foram transferidos 150 µL do sobrenadante contendo os extratos de DNA dos isolados para um microtubo esterilizado e armazenado a -20 °C até o uso.

4.2.2 Quantificação, Pureza e Integridade do DNA

A quantificação do DNA presente nos extratos foi feita a 260 nm em espectrofotômetro UV-VIS Biochrom Libra S22, partindo do suposto de que uma unidade de absorvância equivale a 50 µg mL⁻¹ de DNA de cadeia dupla. A razão das absorvâncias D.O₂₆₀/D.O₂₈₀ foi utilizada como um indicativo da pureza do DNA obtido.

Para verificar a integridade do DNA extraído foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5X. Para esta finalidade, 5 μL dos extratos de DNA foram adicionados de 3 μL de tampão de carregamento 6X (azul de bromofenol 0,025% e glicerol 30% em TBE 0,5X), previamente à aplicação nos gel de agarose. A corrida eletroforética foi efetuada sob 90 V, acompanhando a progressão do corante. Finalizada a corrida, o gel foi transferido para cuba contendo uma solução corante de brometo de etídeo a 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foi deixado nessa solução por cerca de 10 min. Após esse tempo, o gel foi então lavado com água destilada por 10-20 min, analisado e fotografado em um aparelho transluminador com luz UV (Alphaimager MINI Cell Bioscences).

4.2.4 Amplificação e Sequenciamento parcial do gene 16S RNAr

4.2.4.1 Amplificação do gene 16S RNAr por PCR

A amplificação das sequências do gene 16S RNAr dos isolados foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') (YOUNG et al., 1991) (posições 20 a 43 do gene 16S RNAr de *Escherichia Coli*) e y3 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') (CRUZ et al., 2001) (posições 1482 a 1507 do gene 16S RNAr de *E. Coli*).

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 50 μL contendo: 5 μL de tampão 10x (10mM Tris-HCL pH 8,3), 2,2 μL de MgCl_2 (50 mM), 1 μL de dNTPs (mistura com 10 mM de cada base), 1,5 μL de cada iniciador (20 pmol/ μL), 37,3 μL de água ultrapura estéril, 0,5 μL de Taq DNA polimerase (5 U μL^{-1}) e 1 μL DNA molde (50 ng/ μL). A mistura da reação foi submetida ao termociclador Life Express BIOER usando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial (93 °C, 5 min) seguida de 35 ciclos de desnaturação (93 °C, 45 seg), anelamento (64 °C, 45 seg), extensão (72 °C, 2 min) e um ciclo de extensão final a 72 °C por 5 min.

Após amplificação, alíquotas de 5 μL de cada produto da PCR foram adicionadas de 2 μL de tampão de carregamento 6X (azul de bromofenol 0,025% e glicerol 30% em TBE 0,5X) e avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão TBE 0,5X e corado com brometo de etídeo. As amostras que apresentaram

uma banda no tamanho esperado (aproximadamente 1500 pares de bases) foram purificadas para reação de sequenciamento.

4.2.4.2 Purificação dos produtos da amplificação

Para a purificação dos produtos da amplificação do gene 16S RNAr optou-se por recorrer ao método enzimático utilizando ExoSAP-IT® (USB® Corporation, Cleveland, Ohio, USA), que consiste em duas enzimas hidrolíticas, a Exonuclease I e uma Fosfatase Alcalina. A enzima exonuclease I promove a degradação dos iniciadores e DNA de cadeia simples inespecífico, enquanto a Fosfatase Alcalina hidrolisa os nucleotídeos remanescentes. Este conjunto de enzimas é adicionado diretamente ao produto de PCR, uma vez que estas enzimas são ativas no mesmo tampão utilizado para a reação.

Utilizaram-se 2 µL de ExoSAP-IT para cada 10 µL de produto de PCR. As amostras foram submetidas à temperatura de 37 °C por 15 min seguida de 15 minutos a 80 °C para inativação do conjunto de enzimas.

4.2.4.3 Reações de PCR, precipitação e sequenciamento

As reações de PCR para o sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços utilizando-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). O protocolo da reação foi conduzido conforme segue: 3 µL do produto de PCR purificado; 1,0 µL do oligonucleotídeo iniciador 362f (5' CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG 3') (CRUZ et al., 2001) (3,2 pmol/µL); 1,3 µL do terminador Big Dye; 2,5 µL do tampão 5X e água ultrapura esterilizada para completar 20 µL de reação. As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial (96 °C, 1 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (96 °C, 15 seg), anelamento (50 °C, 15 seg) e extensão (60 °C, 4 min).

Decorrida a reação de amplificação, os produtos de PCR foram precipitados pela adição de 65 µL de etanol absoluto e 2 µL de acetato de amônio 7,5 M a cada amostra. As amostras foram em seguida centrifugadas a 2149g por 45 minutos a 23°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 150 µL de etanol 70%, centrifugando-se por mais 20 min a 2149g a 23 °C. Novamente foi descartado o sobrenadante, a placa foi seca a 37 °C por 1 hora e o

DNA foi ressuspendido com 10 μL de formamida. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI PRISM Genetic Analyser® 3100 (Applied Biosystem). A qualidade das sequências obtidas foi verificada usando o programa Bionumerics versão 4.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), sendo removidas das sequências finais as regiões de baixa qualidade.

4.2.5 Análise Filogenética e Determinação dos Índices de Biodiversidade

O posicionamento filogenético dos isolados foi determinado pela aplicação do coeficiente de similaridade do “Ribosomal Database Project” (RDP) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) com auxílio do programa “Classifier” (MAIDAK et al. 1997). Para o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Wiener, foi utilizado o programa DivEs (Diversidade de Espécies v3.0) (RODRIGUES, 2015) a partir dos gêneros encontrados nos nove experimentos realizados. O índice de Shannon-Wiener é um índice de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies e, no presente trabalho, foi aplicado para avaliar a diversidade da comunidade bacteriana dentre os solos e as combinações solos / espécies vegetais e determinar o efeito rizosfera decorrente do cultivo de tomate e lulo sobre as espécies diazotróficas nativas de cada tipo de solo estudado.

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

4.3.1 Produção de Compostos Indólicos

4.3.1.1 Dosagem de Compostos Indólicos

A produção de compostos indólicos pelos isolados foi quantificada colorimetricamente utilizando o reagente de Salkowsky (SARWAR; KREMER, 1995) modificado (BAUTISTA; GALLARDO, 2008). Cada isolado bacteriano foi cultivado em triplicata em meio DYGS líquido sob agitação a 180 rpm por 48 h a 28 °C. Em seguida, cada cultura foi ajustada para uma densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm igual a 0,3 ($DO_{600}=0,3$) e uma alíquota de 100 μL dessa cultura foi inoculada em meio DYGS suplementado com L-triptofano, na concentração final de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, permanecendo sob agitação de 180 rpm por 48 h a 28 °C. Foi utilizado

meio Dygs acrescido de L-triptofano sem o inóculo como controle negativo. Ao final do período de crescimento, uma alíquota de 2 mL da cultura foi coletada e as células foram centrifugadas a 8.000g por 5 min. O extrato livre de células (ELC) foi utilizado nas reações com o reagente de Salkowsky e as células precipitadas foram usadas para determinação de proteínas totais.

A reação foi realizada em tubos de vidro, onde 1 mL do sobrenadante reagiu com 2 mL do reagente de Salkowsky modificado (FeCl_3 40 mM; H_2SO_4 7,9 M). Após 30 minutos de reação no escuro na temperatura ambiente, a intensidade da coloração foi medida a 530 nm em espectrofotômetro UV-VIS Biochrom Libra S22. As medidas foram feitas em triplicata.

Foi feita uma curva padrão com concentrações crescentes (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de ácido-3-indol acético comercial na proporção de 1 mL de padrão de AIA para 2 mL de reagente de Salkowsky, incubando-se durante 30 minutos na temperatura ambiente e fazendo a leitura da absorbância a 530 nm. As medidas foram feitas em triplicata determinando-se a curva de calibração e a equação da reta.

4.3.1.2 Determinação de Proteínas

O teor de proteínas total foi determinado com o objetivo de normalizar as leituras de produção de compostos indólicos. Para determinação de proteínas, a biomassa bacteriana presente no precipitado obtido como descrito anteriormente foi lavada por três vezes em solução salina, ressuspensa em 2mL de NaOH 0,1M para a lise das células e incubadas em banho-maria a 90 °C por 30 minutos. Foi utilizado 0,1 mL deste lisado para a quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). A curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de soroalbumina bovina 1,0 mg mL^{-1} com intervalos de 0 a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.2 Solubilização de Fosfatos

Foi avaliada a capacidade dos isolados para solubilizar os fosfatos inorgânicos de ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e de alumínio (AlPO_4) usando o meio de cultura líquido NBRIP (METHA; NAUTIYAL, 2001), contendo por litro 10 g de glicose, 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl e 0,1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este meio

foi suplementado com $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou AlPO_4 numa concentração final de fósforo (P) de 0,1% (m/v). O pH inicial do meio foi ajustado a 7,0 antes da esterilização por autoclave a 121 °C por 20 min.

A quantificação da solubilização de fosfatos foi conduzida em tubos Falcon (50 mL) contendo 10 mL do meio NBRIP inoculados em triplicata com 100 μL das culturas (previamente crescidas em meio Dygs e com uma $\text{DO}_{600}=0,3$). Como controle negativo foi usado o meio NBRIP esterilizado e sem inoculação de microrganismos. Os tubos foram incubados a 28 °C por 7 dias em agitador orbital a 180 rpm. Após esse período, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 8.000g durante 5 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em filtro qualitativo e usado para medir o pH e para a análise quantitativa de fósforo.

O fósforo solúvel foi avaliado usando o método fosfomolibdico descrito por Murphy e Riley (1962) modificado. Em tubo de ensaio, 1 mL do sobrenadante foi misturado com 2 mL de uma solução de molibdato de amônio diluída e 20 μL de uma solução de ácido ascórbico 5%. Após 30 minutos de reação foi medida a absorbância a 660 nm em espectrofotômetro UV-VIS Biochrom Libra S22. As medidas foram feitas em triplicata. Todas as vidrarias usadas foram previamente lavadas com água deionizada para retirar íons contaminantes. A curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de KH_2PO_4 (25 mg P L⁻¹) com concentrações crescentes de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mg P L⁻¹.

4.3.3 Produção de Sideróforos

Para avaliar a produção de sideróforos, os isolados bacterianos foram inicialmente cultivados em 5 mL de meio Dygs líquido a 28 °C sob agitação constante a 180 rpm por 48 horas.

A produção de sideróforos foi avaliada pelo método do Cromo azulol S (CAS) descrito por Schwyn e Neilands (1987) modificado. O método consiste na utilização de um complexo corante-ferro. Quando o sideróforo é sintetizado e secretado, sequestra o ferro da solução corante, alterando seu perfil de oxidação, fazendo com que o meio mude de cor.

A solução corante é formada por três soluções: A primeira consiste em 60,5 mg de cromo azulol S (CAS) solubilizado em 50 mL de água deionizada; a segunda consiste numa solução de 1 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 10mM de HCl; e a

terceira consiste na solubilização de 72,9 mg de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio) em 40 mL de água deionizada. As três soluções foram misturadas em um frasco Erlenmeyer com capacidade para 250 mL e esterilizadas por autoclave a 121 °C por 15 minutos.

O meio T (PAYNE, 1994) deficiente em ferro foi preparado separadamente, contendo por litro 5,8 g de NaCl, 3,7 g de KCl, 0,15 g de CaCl₂.2H₂O, 0,1 g de MgCl₂.6H₂O, 1,1 g de NH₄Cl, 0,272 g de KH₂PO₄, 0,142 g de Na₂SO₄, 12,1 g de Tris base e 15 g de ágar. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl concentrado e o meio foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos. Após a esterilização o meio foi suplementado com glicose 0,4%.

Para preparo do meio T-CAS, foram adicionados a 900 mL do meio T (após atingir a temperatura inferior a 50 °C) a 100 mL da solução de CAS autoclavada, sendo vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do meio, 2 uL das culturas foram inoculados em triplicata nas placas contendo meio T-CAS e foram incubadas no escuro a 28 °C por 5 dias. Como controle foi realizado o mesmo experimento sem o inóculo. Toda a vidraria utilizada foi enxaguada com solução de HCl 6,0 M para retirada do ferro contaminante.

A formação de halo amarelo ou laranja ao redor das colônias foi assumida como habilidade para produção de sideróforos pelo isolado. Para identificar os isolados com maior capacidade de produção de sideróforos foi determinada a razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise de agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro empregando-se o programa estatístico SASM-AGRI (CANTERI et al., 2001).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, O.; PÉREZ, A. M.; VAILLANT, F. Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 59, n. 1, 2009.
- ADESEMOYE, A. O.; OBINI, M.; UGOJI, E. O. comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 423-426, 2008.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, p. 29-34, 2005.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, p. 173-181, 2008.
- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, 2014.
- ALFONSO, E. T.; LEYVA, A.; HERNÁNDEZ, A. Beneficial microorganisms as eficiente biofertilizers for tomato crops (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 7, n. 2, p. 47-54, 2005.
- ALFONSO, E. T.; PADRON, J. R.; PERAZA, T. T. The effect of a *Pseudomonas aeruginosa* based bioproduct on a tomato crop (*Solanum lycopersicum* Mill.). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 7, n. 1, p. 32-38, 2010.
- ALMAGHRABI, O. A.; MASSOUD, S. I.; ABDELMONEIM, T. S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Science**, v. 20, p. 57–61, 2013.
- ANEJA, K. R. **Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology**, 4^a Ed., Limited Publishers, New Delhi, 2003.
- ANGUS, A. A.; AGAPAKIS, C. M.; FONG, S.; YERRAPRAGADA, S.; DE LOS SANTOS, P. E.; YANG, P.; SONG, N.; KANO, S.; CABALLERO-MELLADO, J.; DE FARIA, S. M.; DAKORA, F. D.; WEINSTOCK, G.; HIRSCH, A. M. Plant-Associated Symbiotic Burkholderia Species Lack Hallmark Strategies Required in Mammalian Pathogenesis. **PLOS ONE**, v. 9, p.1–12, 2014.
- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, p. 57–67, 1998.
- ANTOUN, H.; PRÉVOST, D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: SIDDIQUI, Z. A. **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**, p. 1-38, 2005.

ATLAS, R. M. Diversity of microbial communities. In: MARSHALL, K. C (Ed). **Advances in Microbial Ecology**, Plenum Press, p. 1–47, 1984.

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

BAKKER, P. H. M.; BERENDSEN, R. L.; DOORNBOS, R. F.; WINTERMANS, P. C.; PIETERSE, C. J. The rhizosphere revisited: root microbiomics. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 1-7, 2013.

BAKKER, M. G.; CHAPARRO, J. M.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. **Plant and Soil**, v. 392, n. 1, p. 115-126, 2015.

BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 433-439, 1980.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, 1996.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOE, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 516, p. 911-922, 1997.

BALDOCK, J. A.; BALLARD, R. A. Fixed nitrogen in sustainable farming systems: a symposium examining factors influencing the extent of biological nitrogen fixation and its role in southern Australian agricultural systems. Setting the scene. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1191-1193, 2004.

BALSER, T. C.; WIXON, D.; MORITZ, L. K.; LIPPS, L. The Microbiology of Natural Soils. In: DIXON, G. R.; TILSON, E. L (Eds.). **Soil Microbiology and Sustainable Crop Production**, Springer, p. 27-58, 2010.

BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 168-174, 1998.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. A proposal for the division of "plant growth-promoting rhizobacteria" into two classifications: biocontrol-plant growth-promoting bacteria and plant growth-promoting bacteria. **Soil biology and biochemistry**, v. 30, p. 1225-1228, 1998.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Protection of Tomato Seedlings against Infection by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* by Using the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n.6, p. 2637–2643, 2002.

- BASHAN, Y.; de BASHAN, L. Bacteria - Plant growth-promoting. In: HILLEL, D. **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier, v. 1, p.103-115, 2005.
- BASHAN, L. E. de; HOLGUIN, G.; GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: FERRERA, R.; ALARCON, A. **Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo**. Ciudad de México, editorial Trillas, p. 170-224, 2007.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BAUTISTA, L. X. C.; GALLARDO, I. R. **Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos**. 2008. 140 f. Trabajo de conclusión de curso – Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2008.
- BEASLEY, F. C.; HEINRICHS, D. E. Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 282–288, 2010.
- 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, p. 1044-1051, 2012.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 478-486, 2012.
- BERNAL, J.; CORDOBA, O.; FRANCO, G.; LONDOÑO, M. **El cultivo del lulo (Solanum quitoense Lam.)** In: Memorias Primer Seminario Frutales de Clima Frío Moderado. Manizales, p. 43-52, 1996.
- BEVER, J. D.; BROADHURST, L. M.; THRALL, P. H. Microbial phylotype composition and diversity predicts plant productivity and plant–soil feedbacks. **Ecology Letters**, v. 16, p. 167–174, 2013.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.
- BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, v. 108, p. 53-65, 1988.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139–149, 2003.

BORRIS, R. *Bacillus*, A Plant-Beneficial Bacterium. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). **Principles of Plant-Microbe Interactions - Microbes for Sustainable Agriculture**, Springer Switzerland, p. 379-392, 2015.

BORRIS, R. Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses**, Springer-Verlag Berlin, p. 41-75, 2011.

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

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRICKELL, C. D.; BAUM, B.R.; HETTERSCHEID, W. L. A.; LESLIE, A. C.; MCNEILL, J.; TREHANE, P.; VRUGTMAN, F.; WIERSEMA, J.H. **International Code of Botanical Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bgbm.fu-berlin.de/iapt/nomenclature/code/SaintLouis/0001ICSLContents.htm>>. Acesso em: fevereiro-2014.

BRIMECOMBE, M. J.; DE LEIJ, F. A. A. M.; LYNCH, J. M. Rhizodeposition and Microbial Populations. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (Eds.). **The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface**. 2nd edition. CRC Press, p. 73–109, 2007.

BRINGHURST, R. M.; CARDON, Z. G.; GAGE, D. J. Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 4540–4545, 2001.

BUÉE, M.; DE BOER, W.; MARTIN, F.; VAN OVERBEEK, L.; JURKEVITCH, E. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. **Plant and Soil**, v. 321, p. 189–212, 2009.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

BURNS, R. G.; DEFOREST, J. L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M.D.; WEINTRAUB, M.N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 58, p. 216-234, 2013.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; DE LOS SANTOS, P. E.; MARTINEZ-AGUILAR, L. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n.16, p. 5308–5319, 2007.

CAMARGO, F. P.; ALVES, H. S.; CAMARGO FILHO, W. P.; VILELA, N. J. Cadeia produtiva de tomate industrial no Brasil: resenha da década de 1990, produção regional e perspectivas. **Informações Econômicas**, SP, v. 36, n.11, 2006.

CAMPBELL, R.; GREAVES, M.P. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: LYNCH, J. M. (Ed.). **The Rhizosphere**. New York, p.11-34, 1990.

CANO, M. A. A review of interaction of beneficial microorganisms in plants: Mycorrhizae, Trichoderma spp. and Pseudomonas spp. **Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica**, v. 14, n. 2, p. 15 – 31, 2011.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; DAS VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. Sasm-agri - sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p.18-24, 2001.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Eds.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Instituto Agronômico Campinas (SP), 312 p., 2007.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 440–459, 2014.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA Soja, documentos 139, 36 p., dezembro, 1999.

CHAPARRO, J. M.; SHEFLIN, A. M.; MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 489–499, 2012.

CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **The ISME Journal**, v. 8, p. 790–803, 2014.

CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 186–195, 2006.

CHEN, H.; QUALLS, R. G.; MILLER, G. C. Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 119–128, 2002.

CHENG, H. R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 55–59, 2006.

- COLOMBO, C.; PALUMBO, G.; HE, J. Z.; PINTON, R.; CESCO, S. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 3, p. 538-548, 2014.
- COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural Environment. **FEMS Microbiology Review**, v. 32, p. 607–626, 2008.
- COPLEY, J. Ecology goes underground. **Nature**, London, v. 406, p. 452-454, 2000.
- CORDERO, O. X.; POLZ, M. F. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 263-273, 2014.
- COSTA, R.; GOTZ, M.; MROTZEK, N.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 236–249, 2006.
- CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.
- DAHER, E. Uma crise de demanda. **DBO Agrotecnologia**, abril/maio, 2008.
- DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 401-422, 2007.
- DAS, A. J.; KUMAR, M.; KUMAR, R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): An Alternative of Chemical Fertilizer for Sustainable, Environment Friendly Agriculture. **Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences**, v. 1, n. 4, p. 21-23, 2013.
- DEANGELIS, K. M.; BRODIE, E. L.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; LINDOW, S. E.; FIRESTONE, M. K. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. **The ISME Journal**, v. 3, p. 168–178, 2009.
- DE SALOMONE, I. E. G.; DOBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 249-256, 1996.
- DENG, H. A review of diversity-stability relationship of soil microbial community: What do we not know?. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1027–1035, 2012.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107–149, 2003.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI. 60 p. 1995.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 36, p. 771-774, 1997.

DODD, R. J.; MCDOWELL, R. W.; CONDRON, L. M. Changes in soil phosphorus availability and potential phosphorus loss following cessation of phosphorus fertiliser inputs. **Soil Research**, v. 51, p. 427–436, 2013.

DORAN, J. W.; SARRANTONIO, M.; LIEBIG, M. A. Soil health and sustainability. **Advances in Agronomy**, v. 56, p. 2-54, 1996.
DOURADO, M. N.; MARTINS, P. F.; QUECINE, M. C.; PIOTTO, F. A.; SOUZA, L. A.; FRANCO, M. R.; TEZOTTO, T.; AZEVEDO, R. A. *Burkholderia* sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. **Annals of Applied Biology**, v. 163, p. 494–507, 2013.

DOTANIYA, M. L.; MEENA, V. D. Rhizosphere Effect on Nutrient Availability in Soil and Its Uptake by Plants: A Review. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n.1, p. 1-12, 2014.

EAST, R. Microbiome: Soil science comes to life. **Nature**, v. 501, p. s18-s19, 2013.

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

EMBRAPA. **A cultura do tomateiro (para mesa)**. Brasília: Embrapa – SPI, 92 p., 1993.

EMBRAPA. **Cultivo de tomate para industrialização. Sistemas de produção**, 2ª ed., dezembro, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/>. Acesso em: fevereiro-2014.

ENA. ENCUESTA NACIONAL AGROPECUARIA, Colombia, 2011. Disponível em: <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/ena/doc_anexos_ena_2011.pdf>. Acesso em: janeiro-2014.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**, p.1-42, 1992.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, p. 6-16, 1998.

FIERER, N.; LENNON, J. T. the generation and maintenance of diversity in microbial communities. **American Journal of Botany**, v. 98, n.3, p. 439–448, 2011.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**, 2ª ed., Viçosa, UFV, 2003.

FIORE, A.; LAEVENS, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VANDAMME, P.; CHIARINI, L. Burkholderia cepacia complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 137–143, 2001.

FISHER, K.; NEWTON, W. Nitrogen fixation – A general overview. In: LEIGH, G. J. (Ed.). **Nitrogen Fixation at the Millenium**. Elsevier Publications, p. 1-34, 2002.

FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M. A.; CAPE, J. N.; REIS, S.; SHEPPARD, L. J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, J. N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A. F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twentyfirst Century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, 2013.

FRANCO, G.; BERNAL, J.; GIRALDO, M. J.; TAMAYO, P. J.; CASTAÑO, O.; TAMAYO, A.; GALLEGO, J. L.; BOTERO, M. J.; RODRIGUEZ, J. E.; GUEVARA, N. J.; MORALES, J. E.; LONDOÑO, M.; RIOS, G.; RODRIGUEZ, J. L.; CARDONA, J. H.; ZULETA, J.; CASTAÑO, J.; RAMIREZ, M. C.. **El cultivo del lulo**. Colômbia: CORPOICA, 103 p., 2002.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Bacterial biofertilizers. In: SIDDIQUI, Z. A. **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**, p. 143-172, 2005.

GAMALERO, E.; GLICK, B. R. Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: MAHESHWARI, D. K. **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management**, p. 17-46, 2011.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. **Science**, v. 309, 1387-1390, 2005.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243–270, 2004.

GARDÉ, A.; GARDÉ N. **Culturas hortícolas**. Lisboa: livraria clássica, 493 p., 1964.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109-117, 1995.

GLICK, B. R.; PENROSE, D.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v.190, p. 63–68, 1998.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. 276 p., 1999.

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

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.

GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiology Reviews**, v.37, n.2, p. 112-129, 2013.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspectives and future prospects. **American Journal of Alternate Agriculture**, v. 1, p. 51-57, 1986.

GOTZ, M.; GOMES, N. C. M.; DRATWINSKI, A.; COSTA, R.; BERG, G.; PEIXOTO, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 207–218, 2006.

GUO, J. H.; QI, H. Y.; GUO, Y.H.; GE, H. L.; GONG, L. Y.; ZHANG, L X. SUN, P. H. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 29, p. 66–72, 2004.

GUPTA, G.; SINGH, S.; KUMAR, N.; KUMAR, S.; SINGH, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2015.

GUTIERREZ-MAÑERO, F. J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA A.; MEHOUACHIB, J.; TADEO, F, R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia plantarum**, v. 111, p. 206–211, 2001.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 117–126, 2001.

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

HAEGEMAN, B.; HAMELIN, J.; MORIARTY, J.; NEAL, P.; DUSHOFF, J.; WEITZ, J. S. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. **The ISME Journal**, v.7, p. 1092–1101, 2013.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v. 312, p. 7–14, 2008.

- HAWKES, C. V.; DEANGELIS, K. M.; FIRESTONE, M. K. Root interactions with soil microbial communities and processes. In: CARDON, Z.; WHITBECK, J. (Eds). **The Rhizosphere**. Elsevier, New York, p. 1–25, 2007.
- HEISER, C. The Relationships of the Naranjilla, *Solanum quitoense*. **Biotropica**, v. 4, n. 2, p. 77-84, 1972.
- HEISER, C. B. Ethnobotany of the Naranjilla (*Solanum quitoense*) and Its Relatives. **Economic Botany**, v. 39, n. 1, p. 4-11, 1985.
- HEISER, C.; ANDERSON, G. “New” **Solanums**. In: JANICK, J. Perspectives on New Crops and New Uses, p. 379-384, 1999.
- HERNÁNDEZ, M. I.; CHAILLOUX, M. Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. **Cultivos Tropicales**, v. 25, n. 2, p. 5-12, 2004.
- HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundungung und Brache. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft**, v. 98, p. 59–78, 1904.
- HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology & Biochemistry**, v.42, p. 878-887, 2010.
- HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A proposed genus *Enterobacter*. **Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon**, v. 10, p. 71–74, 1960.
- JANSSEN, P. H. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, 2006.
- JOHNSEN, K.; JACOBSEN, C. S.; TORSVIK, V.; SØRENSEN, J. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 443–453, 2001.
- KENNEDY, A. C. The rhizosphere and spermosphere. In: SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G.; ZUBERER, D. A. (Eds.). **Principles and Applications of Soil Microbiology**. Prentice Hall, New Jersey, p. 389–407, 1998.
- KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 74, p. 65–76, 1999.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. **Plant growth promoting rhizobacteria on radishes**. In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Angers, France, v. 2, p. 879-882, 1978.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 39-44, 1989.

KREBS, B.; H€ODING, B.; K€UBART, S.; WORKIE, M. A.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; BOCHOW, H.; HEVESI, M. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. **Journal of Plant Diseases Protection**, v. 105, p. 181–197, 1998.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 167, p. 493– 499, 2012.

KUYKENDALL, D. L.; YOUNG, J. M.; MARTINEZ, E.; KERR, A.; SAWADA, H. *Rhizobium*, Frank 1889, 338^{AL}. In: GARRITY, G. (Ed.). **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd edition, volume 2, The Proteobacteria, Parte C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Springer, p. 325-340, 2001.

LABUSCHAGNE, N.; PRETORIUS, T.; IDRIS, A. H. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, Microbiology Monographs, Springer-Verlag Berlin, v, 18, p. 211-230, 2010.

LAKSHMANAN, V.; SELVARAJ, G.; BAIS, H. P. Functional Soil Microbiome: Belowground Solutions to an Aboveground Problem. **Plant Physiology**, v. 166, p. 689–700, 2014.

LEDIN, R. B. The naranjilla (*Solanum quitoense* Lam). **Florida state horticultural society**, n. 106, p. 187-190, 1952.

LEMANCEAU, P.; BAUER, P.; KRAEMER, S.; BRIAT, J. F. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. **Plant and Soil**, v. 321, p. 513–535, 2009.

LEMONS, L. N.; FULTHORPE, R. R.; TRIPLETT, E. W.; ROESCH, L. F. W. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 42–51, 2011.

LIM, T. K. **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Fruits**, Springer, v. 6, 2013.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, S. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 606–618, 2011.

LOGANATHAN, M.; GARG, R.; VENKATARAVANAPPA, V.; SAHA, S.; RAI, A. B. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) induces resistance against *Fusarium* wilt and improves lycopene content and texture in tomato. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 11, p. 1105-1111, 2014.

LPV ESALQ. Disponível em: <<http://www.lpv.esalq.usp.br/lpv0621/TOMATE.pdf>>. Acesso em: Fevereiro-2016.

LUDWIG, R. A. Rhizobium free-living nitrogen fixation occurs in specialized nongrowing cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 1566-1569, 1984.

LUGTENBERG, B. J. J.; KRAVCHENKO, L. V.; SIMONS, M. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 439-446, 1999.

LUGTENBERG, B. J.; CHIN-A-WOENG, T. F.; BLOEMBERG, G. V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 373-383, 2002.

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

LYNCH, J. M. Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: LYNCH, J. M. (Ed.). **The Rhizosphere**, Wiley and Sons, p. 1-10, 1990.

LYNCH, J. M.; BENEDETTI, A.; INSAM, H.; NUTI, M. P.; SMALLA, K.; TORSVIK, V.; NANNIPIERI, P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, p. 363-385, 2004.

LYNCH, J. P. Root Phenotypes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. **Plant Physiology**, v. 156, p. 1041-1049, 2011.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, J.; SARAVANAN, V. S.; LEE, K.; SANTHANAKRISHNAN, P. *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant-growth-promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1559-1564, 2010.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M. KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAIDAK, B. L.; OLSEN, G. J.; LARSEN, N.; OVERBEEK, R.; McCAUGHEY, M. J.; WOESE, C. R.; The RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v. 25, 1997

MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. O rei das hortaliças. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, RS, n. 29, p. 28-32, 2005.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C. H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, v. 261, p. 199-208, 2004.

- MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis: a model and research methods, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 883-894, 2011.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 113-140, 1996.
- MARTINEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n.3, p. 293 – 319, 2010.
- MARTÍNEZ, L. L.; PENICHE, R. A. M.; ITURRIAGA, M. H.; MEDRANO, S. M. A.; AGUILAR, J. R. P. characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 36, n. 1, p. 63-69, 2013.
- MATARAZZO, P. H. M. **Desenvolvimento do fruto do lulo (*Solanum quitoense* Lam. var. septentrionale) em Viçosa**, Minas Gerais. Tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, curso de Pós-graduação em fitotecnia, 2010.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Science**, v. 166, p. 525–530, 2004a.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 565–572, 2004b.
- MEDINA, C. I.; LOBO, M.; MARTINEZ, E. Revisión del estado del conocimiento sobre la función productiva del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en Colombia. **Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 10, n. 2, p. 167-179, 2009.
- MEHNAZ, S. *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. In: ARORA, N. K. (Ed.), **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**, Springer India, p. 297-314, 2015.
- MEJÍA, C. M.; GAVIRIA, D.; DUQUE, A. L.; RENGIFO, L.; AGUILAR, E.; ALEGRÍA, A. H. Caracterización fisicoquímica de la variedad castilla del lulo (*solanum quitoense* lam.) en seis estadios de maduración. **VITAE**, v. 19, n. 2, p. 157-165, 2012.
- MENA-VIOLANTE, H. G.; OLALDE-PORTUGAL, V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 103–106, 2007.
- MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J. H.M.; PICENO, Y. M.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.;

BAKKER, P. A. H.M ; RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, p. 1097–1100, 2011.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MESSINGER, J.; LAUERER, M. *Solanum quitoense*, a new greenhouse crop for Central Europe: Flowering and fruiting respond to photoperiod. **Scientia Horticulturae**, v. 183, p. 23–30, 2015.

METHA, S.; NAUTIYAL, C. S. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. **Current microbiology**, v. 43, p. 51–56, 2001.

MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 3075–3084, 2013.

MIMMO, T.; del BUONO, D.; TERZANO, R.; TOMASI, N.; VIGANI, G.; CRECCHIO, C.; PINTON, R.; ZOCCHI, G.; CESCO, S. Rhizospheric organic compounds in the soil–microorganism–plant system: their role in iron availability. **European Journal of Soil Science**, v. 65, n. 5, p. 629–642, 2014.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MULLEN, M. D. Phosphorus in soils: biological interactions. In: HILLEL, D. **Encyclopedia of Soils in the Environment**, Oxford: Elsevier, v. 3, p.210-215, 2005.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A. Modified single solution method for the determination of phosphate in natural Waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAIKA, S.; JEUDE, J. L.; GOFFAU, M.; HILMI, M.; DAM, B. **A cultura do tomate: produção, processamento e comercialização**. Wageningen, Países Baixos, 104 p., 2006.

ÑANDEROGA. Disponível em: <<http://nanderoga.com/nanderoga/index.php/datos-naturales/9-informacion/14-lulo>>. Acesso em: Dezembro-2015.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655–670, 2003.

NEILANDS, J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26723-26723, 1995.

NIE, M.; BELL, C.; WALLENSTEIN, M. D.; PENDALL, E. Increased plant productivity and decreased microbial respiratory C loss by plant growth-promoting rhizobacteria under elevated CO₂. **Scientific Reports**, v. 5: 9212, 2015. doi: 10.1038/srep09212.

NIELSEN, U. N.; AYRES, E.; WALL, D. H.; BARDGETT, R. D. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function Relationships. **European Journal of Soil Science**, v. 62, p. 105–116, 2011.

NÍTOLO, M. **A história de um vilão**. 4 julho de 2014. Disponível em: <http://www.sescsp.org.br/online/artigo/7723_A+HISTORIA+DE+UM+VILAO#/tagcloud=lista>. Acesso em: Fevereiro de 2016.

NURO, A. **Absorção de nutrientes pela cultura do lulo (Solanum quitoense Lam. variedade septentrionale)**. Tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, curso de Pós-graduação em fitotecnia, 2012.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56-77, 2014.

OUTLAW. Disponível em: <<http://outlawgarden.blogspot.com.br/2013/06/solanum-quitoense-my-favorite-plant.html>>. Acesso em: Dezembro-2015.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, v. 3, n. 3, p. 236–251, 2000.

PARMAR, N.; DUFRESNE, J. Beneficial interactions of plant growth promoting rhizosphere microorganisms. In: SINGH, A.; PARMAR, N.; KUHAD, R. C. (Eds). **Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol, soil biology**, Springer, Berlin, v.28, p. 27–42, 2011.

PATIL, V. Production of Indole Acetic Acid by *Azotobacter* sp. **Recent Research in Science and Technology**, v. 3, n. 12, p. 14-16, 2011.

PAUNGFUO-LONHIENNE, C.; LONHIENNE, T. G. A.; YEOH, Y. K.; WEBB, R. I.; LAKSHMANAN, P.; CHAN, C. X.; LIM, P. E.; RAGAN, M. A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. A new species of Burkholderia isolated from sugarcane roots promotes plant growth. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p. 142–154, 2014.

PAYNE, S. M. Detection, isolation and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 329–344, 1994.

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2158–2163, 2008.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. History, Origin and Early Cultivation of Tomato (*Solanaceae*). In: RAZDAN, M. K.; MATTOO, A. K (Eds.). **Genetic improvement of solanaceius crops: tomato**, Science Publisher, p. 1-24, 2007.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R. A.; del CERRO, P.; ESPUNY, M. R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; OLLERO, F. J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 325-336, 2014.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; de los SANTOS, P. E.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 1931–1937, 2006.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789–799, 2013.

PIOTTO, P. A.; PERES, L. E. P. Base genética do hábito de crescimento e florescimento em tomateiro e sua importancia na agricultura. *Ciência Rural*, v. 42, n. 11, p. 1941-1946, 2012.

PODILE, A. R.; KISHORE, G. K. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S. S. **Plant-Associated Bacteria**, p. 195–230, 2006.

PORCEL, R.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. M.; AROCA, R. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 36, 12 p., 2014.

PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, p. 63-77, 2014.

PULIDO, L. E.; MEDINA, N.; CABRERA, A. La biofertilización com rizobactérias y hongos micorrízicos arbusculares em la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.). I. Crecimiento vegetativo. **Cultivos tropicales**, v. 24, n. 1, p. 15-24, 2003.

QUINCHIA, F.; CABRERA, C. A. **Manual técnico del cultivo de lulo (*Solanum quitoense* Lam) en el departamento del Huila**. Colombia, 2006.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 429–441, 2002.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 71, p. 1193–1201, 2005.

RAMÍREZ, C. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, p. 835–844, 2010.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The Natural History of Nitrogen Fixation The Natural History of Nitrogen Fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541–554, 2004.

RAYNAUD, X.; NUNAN, N. Spatial Ecology of Bacteria at the Microscale in Soil. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, e 87217, 2014.

REDDY, P. P. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection**. Springer India, 310 p., 2014.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, p. 489–512, 2011.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**, p.153-174, 2006.

RICHARDSON, A. E.; LYNCH, J. P.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E.; HARVEY, P. R. RYAN, M. H.; VENEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; OBERSON, A.; CULVENOR, R. A.; SIMPSON, R. J. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. **Plant and Soil**, v. 349, p. 121-156, 2011.

ROBERTS, D. P.; BAKER, C. J.; MCKENNA, L.; LIU, S.; BUYER, J. S.; KOBAYASHI, D. Y. Influence of host seed on metabolic activity of *Enterobacter cloacae* in the spermosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 754–761, 2009.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 16, 1986.

RODRIGUES, W. C. **DivEs - Diversidade de Espécies v3.0** - Guia do Usuário. Entomologistas do Brasil. 33p., 2015.

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

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A. O.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, n. 4, p. 283–290, 2007.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, v. 181, p. 337–344, 2004.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.

RYAN, P. R.; DESSAUX, Y.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Rhizosphere engineering and management for sustainable agricultura. **Plant and Soil**, v. 321, p. 363–383, 2009.

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

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**, 682 p., 1992.

SALISBURY, F. B. The role of plant hormones. In: WILKINSON, R. E. **Plant Environment Interactions**, p. 39–81, 1994.

SANGEETHA, G.; THANGAVELU, R.; RANI, S. U.; MUTHUKUMAR, A.; UDAYAKUMAR, R. Induction of systemic resistance by mixtures of antagonistbacteria for the management of crown rot complex on banana. **Acta of Physiology Plant**, v. 32, p. 1177–1187, 2010.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, 2013. doi: 10.1093/aob/mct048.

SANTOS, F. F. B. **Obtencao e seleção de híbridos de tomate visando à resistência ao Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)**. Tese de Mestrado. Instituto Agronômico de Campinas- Curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, 2009.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 202-205, 1995.

SCHNEIDER, K. D.; VAN STRAATEN, P.; DE ORDUÑA, R. M.; GLASAUER, S.; TREVORS, J.; FALLOW, D.; SMITH, P. S. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 266-274, 2010.

SCHNITZER, S. A.; KLIRONOMOS, J. N.; HILLERISLAMBERS, J.; KINKEL, L. L.; REICH, P. B.; XIAO, K.; RILLIG, M. C.; SIKES, B. A.; CALLAWAY, R. M.; MANGAN, S. A.; Van NES, E. H.; SCHEFFER, M. Soil microbes drive the classic plant diversity–productivity pattern. **Ecology**, v. 92, n. 2, p. 296–303, 2011.

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

SEMENOV, A. M.; VAN BRUGGEN, A. H. C.; ZELENEV, V. V. Moving Waves of Bacterial Populations and Total Organic Carbon along Roots of Wheat. **Microbial Ecology**, v. 37, p. 116–128, 1999.

SHEN, J.; YUAN, L.; ZHANG, J.; LI, H.; BAI, Z.; CHEN, X.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 997-1005, 2011.

SHOEBITZ, M.; RIBAUDO, C. M.; PARDO, M. A.; CANTORE, M. L.; CIAMPI, L.; CURÁ, J. A. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. **Soil biology and biochemistry**, v. 41, p. 1768-1774, 2009.

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

SNA. **Brasil está mais dependente da importação de fertilizantes**. 13 julho 2015. Disponível em: <<http://sna.agr.br/brasil-esta-mais-dependente-da-importacao-de-fertilizantes>> Acesso em: dezembro 2015.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology**. Springer-Verlag New York, 435 p., 1994.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, p. 205-240, 2004.

SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; da COSTA, P. B.; MEYER, J.; VARGAS, L. K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L. M. P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, v. 366, p. 585-603, 2013.

SOUZA, N. Pesquisa comprova potencial do lulo. **Estadão**, São Paulo, 01 julho 2009. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/geral,pesquisa-comprova-potencial-do-lulo,395984>>. Acesso em: julho 2014.

STEER, J.; HARRIS, J. A. Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 869-878, 2000.

STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. Cycles of soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorous, Sulfur. **Micronutrients**, 2a ed, 1999.

TENORIO-SALGADO, S.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; PEREZ-RUEDA, E. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. **Bioengineered**, v. 4, n. 4, p. 236–243, 2013.

TKACZ, A.; POOLE, P. Role of root microbiota in plant productivity. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 8, p. 2167–2175, 2015.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial Diversity, Life Strategies, and Adaptation to Life in Extreme Soils. In: DION, P.; NAUTIYAL, C. S. **Microbiology of Extreme Soils**. Springer, Berlin, v. 13, p. 15-43, 2008.

TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. **BioMed Research International**, 11 p., 2013.

TURNER, B. L.; LAMBERS, H.; CONDRON, L. M.; CRAMER, M. D.; LEAKE, J. R.; RICHARDSON, A. E.; SMITH, S. E. Soil microbial biomass and the fate of phosphorus during long-term ecosystem development. **Plant and Soil**, v. 367, p. 225–234, 2013.

VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. **Modern Soil microbiology**. Marcel Dekker, Inc., 688 p., 1997.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 243–254, 2007.

VARELA, J. C.; VELASQUEZ, J. C.; MEJIA, M. S. Respuesta fisiológica del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) a diferentes concentraciones de N, P, K, Ca y Mg en la solución nutritiva. **Acta Agronómica**, v. 51, n. 1, p. 53-59, 2001.

VASSILEVA, M.; AZCON, J.; BAREA, J. M.; VASSILEV, N. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp. on plant growth and phosphate uptake. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 229-232, 1999.

VÁZQUEZ, M. M.; CÉSAR, S.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p.261-272, 2000.

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não leguminosas**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, documentos 234, 74 p., 2007.

VIVEROS, O. M.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293-319, 2010.

WEERT, S.; BLOEMBERG, G. V. Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontrol. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.). **Plant-Associated Bacteria**, Springer Netherlands, p. 317-333, 2006.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in plant science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009.

YANNI, Y.G.; RIZK, R. Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; DE BRUIJN, F.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. M.; MATEOS, P. F.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, p. 99–114, 1997.

YANG, x.; POST, W. M.; THORNTON, P. E.; JAIN, A. The distribution of soil phosphorus for global biogeochemical modeling. **Biogeosciences**, v. 10, p. 2525–2537, 2013.

YEVDOKIMOV, I. V. Dynamics of the Rhizosphere Effect in Soils. **Eurasian Soil Science**, v. 46, n. 6, p. 676–684, 2013.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 2271–2277, 1991.

ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. **Advances in agronomy**, v. 81, p. 97-168, 2004.

ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 143–153, 2001.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil: A brief review. **Journal of Soils and Sediments**, v. 8, p. 379–388, 2008.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391–411, 2003.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho foram redigidos no formato preliminar de artigo científico.

ARTIGO**Efeito rizosfera de tomate (*Solanum lycopersicum*) e lulo (*Solanum quitoense*) sobre a diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal em solos com diferentes manejos****Versão preliminar****(Será editado seguindo as normas da revista Plant and Soil)****Mónica Yorlady Alzate Zuluaga • Karina Maria Lima Milani • Leandro Simões
Azeredo Gonçalves • André Luiz Martinez de Oliveira**

M. Y. A. Zuluaga • K. M. L. Milani • A. L. M. Oliveira

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380

Londrina, PR, Brasil

L. S. A. Gonçalves

Departamento de Agronomia

Universidade Estadual de Londrina

Resumo

Antecedentes e Objetivo As interações entre os microrganismos do solo e as plantas estão relacionadas com a qualidade e quantidade de material exsudado pelas raízes num fenômeno conhecido como efeito rizosfera. Foi avaliada a influência do efeito rizosfera de tomate (*Solanum lycopersicum*) e lulo (*Solanum quitoense*) sobre a densidade e diversidade de bactérias diazotróficas nativas de solos com diferentes tipos de manejo: mata secundária (MS), hortícola convencional (HC) e orgânico (ORG).

Métodos O isolamento de bactérias diazotróficas dos solos não rizosféricos assim como da rizosfera de tomate e lulo foi realizado usando cinco meios semi-sólidos livres de nitrogênio e a população foi quantificada pela técnica do número mais provável (NMP). Foi feito o sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e o índice de Shannon-Wiener foi usado para determinar a diversidade bacteriana. Foi avaliado o potencial biotecnológico dos isolados referente as suas capacidades para produzirem compostos indólicos, sideróforos e solubilizar fosfatos inorgânicos.

Resultados Foram obtidas 117 bactérias diazotróficas em populações acima de 1×10^4 células g^{-1} de raiz ou solo, das quais 114 foram identificadas taxonomicamente representando 14 gêneros diferentes. As populações nos solos não rizosféricos para cada meio semi-sólido utilizado foram mais baixas quando comparadas às populações na presença de cada espécie vegetal. O efeito rizosfera do tomate plantado nos solos MS e HC exerceu uma maior influência sobre a densidade populacional de bactérias diazotróficas quando comparado com o efeito rizosfera do lulo. Estirpes pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Enterobacter* foram as mais abundantes e as que apresentaram um maior potencial biotecnológico.

Conclusões O efeito rizosfera diminui a diversidade de bactérias diazotróficas associadas ao tomate e lulo, mas aumentou a densidade populacional de determinados gêneros bacterianos. Isolados dos gêneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Enterobacter* se destacaram como estirpes com potencial para a formulação de novos biofertilizantes para a cultura do tomate.

Palavras-chave Bactérias diazotróficas • Exsudatos • Sideróforos • Densidade populacional • *Rhizobium*

Abstract

Background and aims The interactions between soil microorganisms and plants are related to the quality and quantity of material exuded by the roots in a phenomenon known as the rhizosphere effect. It was evaluated the influence of the rhizosphere effect promoted by two *Solanum* species, *S. lycopersicum* (tomato) and *S. quitoense* (lulo) on the community of nitrogen fixing-bacteria in soils under different three types of management as secondary forest (SF), conventional horticultural (CH) and organic (ORG).

Methods The isolation of diazotrophic bacteria from non rhizospheric soil as well as tomato and lulo rhizosphere was performed using five N-free semi-solid media and the population was quantified by the most probable number (MPN) method. The taxonomic position of isolates was performed by the partial sequencing of the 16S rRNA gene, using the Shannon-Wiener index to determine bacterial diversity. The isolates were also characterized for its plant growth-promotion traits, as indole compounds production, siderophores production and solubilization of inorganic phosphates.

Results A total of 117 bacterial isolates in populations above 1×10^4 cells g^{-1} of rhizosphere or soil were obtained and 114 were taxonomically positioned representing 14 different genera. The populations in non-rhizospheric soil for each semi-solid media used were lower as compared to populations in the presence of each plant species. O efeito da rizosfera de tomate plantadas em solos MS e HC, exercida uma maior influência sobre a densidade populacional das bactérias diazotrófica como comparado com o efeito da rizosfera de lulo. Strains belonging to *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Enterobacter* genus were the most abundant and those who had a greater biotech potencial.

Conclusions The rhizosphere effect diminishes the diversity of diazotrophic bacteria associated with tomato and lulo, but increased the population density of some bacterial genera. Strains of *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Enterobacter* genus, stood out as strains with potential for the development of new biofertilizers for tomato crop.

Keywords Diazotrophic bacteria • Exudates • Siderophores • Population density • *Rhizobium*

Introdução

O aumento da população mundial tem incrementado o uso de práticas agrícolas intensivas que garantem alta produtividade, porém requerem o uso de grandes quantidades de fertilizantes minerais e insumos químicos que são caros e podem provocar graves problemas ambientais. No entanto, nos últimos anos tem havido um crescente interesse na busca por práticas agrícolas sustentáveis e amigáveis com o meio ambiente, que reduzam o uso de produtos químicos e aumentem o uso de sistemas de produção mais naturais, que utilizem adubos verdes, rotação de culturas, controle biológico de pragas, biofertilização com microrganismos, entre outros. A rizosfera, que é definida como a região do solo que está ligada pelas raízes das plantas (Bringhurst et al. 2001), tem sido frequentemente utilizada como o melhor ambiente para o isolamento de microrganismos com potencial uso como biofertilizantes (Bashan 1998; Vessey 2003; Kennedy et al. 2004; Mehnaz 2015). Estes microrganismos são conhecidos por melhorar o crescimento das plantas e ajudar a manter a produtividade do solo (Fuentes-Ramirez e Caballero-Mellado 2006). Nesse sentido, a compreensão da estrutura e dinâmica da comunidade microbiana associada à rizosfera das plantas é essencial para o sucesso de uso desses microrganismos como biofertilizantes em sistemas agrícolas extensivos.

Existem várias interações entre os microrganismos do solo e as plantas que estão intimamente relacionadas com a qualidade e quantidade de compostos liberados pelas raízes (Yevdokimov 2013), que favorecem a manutenção de elevadas populações microbianas na rizosfera quando comparadas com o solo não rizosférico. Esse fenômeno é conhecido como efeito rizosfera (Berendsen et al. 2012). No entanto, vários fatores ambientais podem influenciar a quantidade e composição dos exsudatos radiculares e, conseqüentemente, a diversidade da comunidade microbiana também varia de acordo com esses mesmos fatores ambientais que influenciam a exsudação. Nesse sentido, a rizosfera pode ser considerada como um sistema de interação solo-planta-microrganismos (Brimecombe et al. 2007). Diversos fatores bióticos e abióticos têm sido reportados por influenciar a composição da comunidade microbiana no solo e na rizosfera (Fierer e Jackson 2006; Ibekwe et al. 2010; Chowdhury et al. 2011). Dentre eles, a espécie vegetal (Wieland et al. 2001; Marschner 2004; Costa et al. 2006) e o tipo de

solo (Latour et al. 1996; Groffman et al. 1996; Horwath et al. 1998) são dois dos fatores importantes que modulam essa diversidade.

Um dos principais aspectos para estudar a dinâmica das populações microbianas da rizosfera é a influência que exercem sobre as plantas (Lynch 1990). Vários estudos têm demonstrado que bactérias isoladas da rizosfera de diferentes espécies vegetais tem a capacidade de promover o crescimento das plantas de forma direta ou indireta, por meio de um ou mais mecanismos (Glick 1995; Ahmad 2008; Kumar 2012).

Essas bactérias são denominadas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) (Bashan e Holguin 1998, Lugtenberg 2009). A promoção direta inclui a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno, enquanto a promoção indireta está relacionada com o controle biológico e inclui a estimulação da resistência sistêmica da planta, a produção de substâncias como sideróforos, antibióticos, ácido cianídrico (HCN) e enzimas extracelulares (Zahir et al. 2004; Antoun e Prévost 2005; Glick et al. 2007; Bashan et al. 2007; Gamalero e Glick 2011). Porém, a complexidade das interações entre as BPCV e a planta hospedeira resultam em grande desafio para o alcance de associações compatíveis eficientes nos diferentes ambientes produtivos, por sua vez são influenciados por fatores particulares a cada ambiente. Neste sentido, é necessário um maior entendimento das características determinantes das associações compatíveis que ocasionem a máxima expressão dos efeitos promotores do crescimento exercidos por BPCV, de forma a permitir o desenvolvimento de metodologias para formulação de biofertilizantes de alta eficiência.

Tradicionalmente, BPCV como as do gênero *Azospirillum* tem sido isoladas a partir da rizosfera de diversas gramíneas e cereais ao redor do mundo, tanto em climas temperados como tropicais (Steenhoudt e Vanderleyden 2000). No entanto, poucos estudos têm sido realizados em hortaliças como o tomate, e nenhum estudo está disponível para o lulo. Os objetivos deste trabalho foram: (1) estudar o efeito rizosfera promovido por duas espécies de *Solanum* (*S. lycopersicum* – tomate; e *S. quitoense* – lulo) sobre a comunidade de bactérias diazotróficas em solos sob diferentes tipos de manejo (pousio, agrícola convencional e agrícola orgânico); (2) identificar filogeneticamente e caracterizar os isolados obtidos quanto ao potencial uso como insumo biológico para a promoção do crescimento de tomate.

Material e Métodos

Amostragem do Solo

Foram utilizadas amostras da camada 0-10 cm de solos sob três diferentes sistemas de manejo: mata secundária (MS), hortícola convencional (HC) e orgânico (ORG), coletadas de áreas da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (23°20'S, 51°12'W), localizada no estado de Parana, Brasil, secas à sombra e sob temperatura ambiente, sendo armazenadas nestas condições até o momento do uso. As características químicas dos solos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Características químicas dos solos utilizados neste estudo

Parâmetros	Solo HC	Solo MS	Solo ORG
Matéria Orgânica (%)	2,6	7,5	3,0
pH CaCl ₂	5,6	5,1	5,3
pH SMP	6,3	5,7	6,3
K (cmol _c /dm ³)	0,9	0,4	0,7
Ca (cmol _c /dm ³)	8,1	9,9	7,3
Mg (cmol _c /dm ³)	0,8	1,4	0,9
Al (cmol _c /dm ³)	0,0	0,0	0,0
P (mg/dm ³)	58,3	2,0	8,9
C (%)	1,5	4,4	1,7

HC: solo sob manejo hortícola convencional; MS: solo sob manejo de mata secundária; ORG: solo sob manejo orgânico.

Material vegetal

As estirpes bacterianas foram isoladas de cada tipo de solo e da rizosfera de tomate (*S. lycopersicum*) e lulo (*S. quitoense*) cultivadas nesses mesmos solos. Para o cultivo das plantas foram preparados vasos com capacidade de 500 mL para cada um dos tipos de solo estudados, preenchidos com 1 kg de solo e a partir de então foram denominados de microcosmos. Os microcosmos foram semeados com três sementes de tomate (cv. Santa Adélia, Topseed) ou três sementes de lulo (Fercon), conforme o tratamento, e após 15 dias de semeadura foi realizado o desbaste mantendo-se uma planta em cada microcosmo, mantidos em casa de vegetação por um período de 30 dias para tomate e 60 dias para lulo. No total, cada espécie vegetal foi cultivada em três tipos de solo diferentes, com três repetições para cada

tipo de solo. Após o período de cultivo, as plantas foram coletadas e imediatamente transportadas ao laboratório de bioquímica da UEL. Após lavagem do sistema radicular das plantas com água destilada esterilizada, as raízes foram separadas com o auxílio de lâmina esterilizada sob condições assépticas, e utilizadas para o isolamento de bactérias associativas.

Isolamento bacteriano

Para o isolamento de diazotróficos a partir da rizosfera de tomate e de lulo, foram formadas amostras a partir do sistema radicular de cada planta mantida na condição avaliada. Ao total foram preparadas três amostras para cada espécie vegetal crescida sob cada tipo de solo, resultando em nove amostras por espécie vegetal. As raízes de cada amostra foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento sob condições assépticas e 1 g de raiz foi macerada na presença de 9 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%). Os homogenatos foram seriadamente diluídos (v/v) até a obtenção da diluição 10^{-6} , sendo utilizadas para o isolamento das rizobactérias as diluições 10^{-4} a 10^{-6} , buscando obter somente os representantes da comunidade bacteriana presentes em elevadas populações.

Previamente ao isolamento das bactérias diazotróficas da rizosfera das duas espécies vegetais, foi feito o isolamento das bactérias diazotróficas nativas dos diferentes tipos de solo na ausência de plantas (solos não rizosféricos). Para estimular a atividade microbiana, 10 g de cada tipo de solo foram acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, em triplicata para cada tipo de solo estudado, e adicionadas de 2 mL de água destilada esterilizada seguindo uma incubação por 48 horas a 28°C de temperatura. Após o período de incubação, as amostras foram adicionadas de 90 mL de solução salina esterilizada e mantidas sob agitação orbital a 180 rpm por 30 min (diluição 10^{-1} , m/v), sendo a seguir realizada a diluição seriada das amostras até a obtenção da diluição 10^{-6} . As diluições 10^{-4} a 10^{-6} foram utilizadas para o isolamento das bactérias diazotróficas.

Para o isolamento de bactérias diazotróficas das amostras vegetais e dos solos, frascos contendo 5 mL dos meios semi-sólidos livres de nitrogênio NFb, JMV, JNFb, LGI e LGI-P (Döbereiner et al. 1995; Baldani et al. 2000) foram inoculados com 0,1 mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , em triplicata para cada diluição e meio de cultivo, e incubados a 28 °C por 7-10 dias. Os frascos que apresentaram

crescimento positivo foram repicados para novos frascos contendo os respectivos meios de cultura semi-sólidos seletivos livres de nitrogênio, repetindo-se este processo por mais duas vezes. A contagem de bactérias foi realizada usando o método do número mais provável (NMP) com auxílio da Tabela de McCrady. Os isolados considerados diazotróficos foram armazenados a -20°C em solução Dygs:glicerol (1:1).

Extração de DNA e Identificação filogenética dos isolados

Para a obtenção do DNA total as estirpes bacterianas foram crescidas em meio Dygs por 24-48 horas a 28°C em rotação orbital a 180 rpm. A extração do DNA genômico total foi realizada usando o método do fenol:clorofórmio descrito por Cheng e Jiang (2006). O posicionamento filogenético dos isolados foi obtido pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr usando os iniciadores universais y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') (Young et al. 1991) e y3 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') (Cruz et al. 2001). A reação de amplificação foi realizada seguindo o protocolo de Perret e Broughton (1998). Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação EXOSAP-IT (USB corp.), de acordo com as instruções do fabricante e foram sequenciados usando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI PRISM Genetic Analyser® 3100 (Applied Biosystem). A qualidade das sequências obtidas foi verificada usando o programa Bionumerics versão 4.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), sendo removidas das sequências finais as regiões de baixa qualidade.

Análise filogenética e determinação dos índices de biodiversidade

O posicionamento filogenético dos isolados foi determinado pela aplicação do coeficiente de similaridade do Ribosomal Database Project (RDP) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) com auxílio do programa "Classifier" (MAIDAK et al. 1997). Para o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Wiener, foi utilizado o programa DivEs (Diversidade de Espécies v3.0) (RODRIGUES, 2015) a partir dos gêneros encontrados nos nove experimentos realizados.

Determinação *in vitro* da capacidade de promoção do crescimento vegetal

Produção de Compostos Indólicos

A produção de compostos indólicos foi quantificada colorimetricamente utilizando o reagente de Salkowsky (Sarwar e Kremer 1995)) modificado conforme Bautista e Gallardo (2008). As determinações foram feitas em triplicata e como controle positivo foram usadas as estirpes padrão BR11001 (*Azospirillum brasilense*) e BR11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). O teor de proteínas total foi determinado com o objetivo de normalizar as leituras de produção de indoles seguindo o método de Bradford (1976).

Solubilização de fosfatos

Foi avaliada a capacidade dos isolados para solubilizar os fosfatos inorgânicos de ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e de alumínio (AlPO_4) usando o meio de cultura líquido NBRIP (Metha e Nautiyal 2001) suplementado com $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou AlPO_4 , numa concentração final de fósforo de 0,1% (m/v). A quantificação da solubilização de fosfatos foi conduzida em frascos de 50 mL contendo 10 mL do meio NBRIP inoculados em triplicata com 100 μL da cultura (previamente crescida em meio Dygs e com uma $\text{DO}_{600} = 0,3$). Os tubos foram incubados a 28 °C por 7 dias em agitador orbital a 180 rpm. Após esse período, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 8.000g durante 5 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em filtro qualitativo e usado para medir o pH e para a análise quantitativa de fósforo. O fósforo solúvel foi avaliado usando o método fosfomolibdico descrito por Murphy e Riley (1962) modificado. As medidas foram feitas em triplicata, utilizando como controle negativo o meio NBRIP sem inoculação (para cada fonte de P insolúvel). A capacidade de cada estirpe para solubilizar fosfatos foi determinada pela diferença entre a concentração de fósforo solúvel encontrada no meio de cultura inoculado e a concentração no respectivo tratamento controle.

Produção de sideróforos

A produção de sideróforos pelos isolados bacterianos foi avaliada pelo método do Cromo Azurol S (CAS) descrito por Schwyn e Neilands (1987), modificado. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl concentrado e o meio foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos, sendo em seguida suplementado com glicose 0,4%. Um volume de 2 uL das culturas foram inoculados em triplicata nas placas contendo meio T-CAS e foram incubadas no escuro a 28 °C por 5 dias. A formação de halo amarelo ou laranja ao redor das colônias foi assumida como capacidade para produção de sideróforos. A razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia foi usada para calcular o índice de produção de sideróforos (IPS).

Potencial biotecnológico dos isolados

O potencial biotecnológico de cada isolado foi arbitrariamente determinado considerando a capacidade de promoção do crescimento vegetal pela atribuição de notas entre 0 a 3, respectivas a cada ensaio realizado *in vitro*. A escala de notas considerou o seguinte: nota 0: ausência de atividade; nota 1: atividade baixa (35% abaixo do valor médio de atividade encontrado para o conjunto de isolados positivos); nota 2: atividade moderada (entre 35% abaixo e 35% acima do valor médio de atividade encontrado para o conjunto de isolados positivos); nota 3: atividade elevada (35% acima do valor médio de atividade encontrado para o conjunto de isolados positivos). A classificação dos isolados de acordo com o seu potencial biotecnológico foi obtida pelo somatório das notas atribuídas para cada uma das atividades de promoção de crescimento avaliadas, sendo catalogados como segue: sem potencial (nota total igual a 0); baixo potencial (nota total entre 1 e 3); médio potencial (nota total entre 4 e 6) e alto potencial (nota total entre 7 e 9).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott (5% de probabilidade) empregando-se o programa estatístico SASM-AGRI (Canteri et al. 2001).

Resultados

Isolamento bacteriano e efeito rizosfera

Foram isoladas um total de 117 bactérias diazotróficas utilizando cinco meios semi-sólidos semi-seletivos livres de nitrogênio (Tabela 2).

Tabela 2 Número de bactérias diazotróficas isoladas de solos não rizosféricos com diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, utilizando os meios semi-sólidos livres de nitrogênio JMV, NFb, JNFb, LGI e LGI-P.

EXPERIMENTO	MEIOS LIVRES DE NITROGÊNIO					TOTAL ^e	
	JMV	NFb	JNFb	LGI	LGI-P		
SOLO ^a	MS	7	0	3	0	0	10
	HC	0	0	5	0	0	5
	ORG	11	0	2	1	0	14
	total ^d	18	0	10	1	0	29
RIZOSFERA TOMATE ^b	MS	7	2	3	4	1	17
	HC	11	2	3	4	0	20
	ORG	6	0	5	1	0	12
	total ^d	24	4	11	9	1	49
RIZOSFERA LULO ^c	MS	6	1	5	1	2	15
	HC	2	1	2	1	0	6
	ORG	7	1	5	5	0	18
	total ^d	15	3	12	7	2	39
TOTAL DE ISOLADOS						117	

MS: solo sob manejo de mata secundária; HC: solo sob manejo hortícola convencional; ORG: solo sob manejo orgânico. ^a Experimento utilizando cada um dos tipos de solos não rizosféricos (MS, HC ou ORG). ^b Experimento utilizando a rizosfera de tomate plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG). ^c Experimento utilizando a rizosfera de lulo plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG). ^d Resultado da soma do número de isolados para cada meio semi-sólido utilizado em cada grupo de experimentos (solos, rizosfera de tomate ou rizosfera de lulo). ^e Resultado da soma do número de bactérias isoladas utilizando os cinco meios semi-sólidos para cada experimento.

No experimento com os solos não rizosféricos foram obtidas 29 bactérias e nos experimentos com a rizosfera de tomate e de lulo foram obtidos 49 e 39 isolados, respectivamente. Dentre os solos não rizosféricos, aquele que forneceu um maior

número de isolados foi o solo ORG (14 isolados). O tomate plantado no solo HC foi o que forneceu um maior número de isolados diazotróficos (20 isolados), enquanto que o lulo plantado no solo ORG foi o que forneceu maior número de isolados diazotróficos (18 isolados).

Considerando os diferentes meios de cultura utilizados para o isolamento de bactérias diazotróficas, o meio semi-sólido que selecionou um maior número de bactérias em todos os experimentos foi o JMV (57 isolados), seguido pelos meios JNFb, LGI, NFb e LGI-P que selecionaram 33, 17, 7 e 3 isolados respectivamente (Tabela 2); entretanto, nenhuma bactéria foi isolada das amostras de solo não rizosférico a partir dos meios de cultivo NFb e LGI-P.

A contagem de bactérias diazotróficas foi realizada pelo método do número mais provável (NMP), obtendo-se populações que variaram de 1×10^4 a 18×10^4 bactérias g^{-1} solo ou raiz entre os experimentos e meios utilizados (Tabela 3).

Tabela 3 Densidade populacional de microrganismos diazotróficos $\text{Log}_{10}(\text{NMP} \times 10^4 \text{ células } g^{-1})$ de solos não rizosféricos com diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, utilizando os meios semi-sólidos livres de nitrogênio JMV, NFb, JNFb, LGI e LGI-P

EXPERIMENTO	MEIOS LIVRES DE NITROGÊNIO ^d					TOTAL ^e	
	JMV	NFb	JNFb	LGI	LGI-P		
SOLO ^a	MS	4,88 ± 2,85	0	4,52 ± 2,70	0	0	5,04
	HC	0	0	4,88 ± 0,33	0	0	4,89
	ORG	5,20 ± 0,48	0	4,12 ± 2,66	4,12 ± 2,66	0	5,27
RIZOSFERA TOMATE ^b	MS	5,26 ± 3,08	4,48 ± 2,86	4,52 ± 0,07	4,30 ± 2,58	4,00 ± 2,58	5,44
	HC	4,95 ± 0,10	4,43 ± 2,66	4,60 ± 0	4,60 ± 0	0	5,29
	ORG	4,90 ± 0,23	0	4,80 ± 0,25	4,00 ± 2,58	0	5,18
RIZOSFERA LULO ^c	MS	5,0 ± 0,20	4,00 ± 2,58	4,92 ± 0,06	4,52 ± 0,07	4,43 ± 2,66	5,40
	HC	4,56 ± 0,07	4,00 ± 2,58	4,37 ± 2,62	4,37 ± 2,80	0	4,97
	ORG	4,75 ± 0,20	4,00 ± 2,58	4,88 ± 0,33	4,95 ± 0,36	4,12 ± 2,66	5,39

MS: solo sob manejo de mata secundária; HC: solo sob manejo hortícola convencional; ORG: solo sob manejo orgânico. ^a Experimento utilizando cada um dos tipos de solos não rizosféricos (MS, HC ou ORG). ^b Experimento utilizando a rizosfera de tomate plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG). ^c Experimento utilizando a rizosfera de lulo plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG). ^d Média ± desvio padrão do $\text{NMP} \times 10^4$ células g^{-1} para cada meio semi-sólido em cada experimento. ^e Resultado da soma do $\text{NMP} \times 10^4$ de bactérias nos cinco meios semi-sólidos para cada experimento.

Uma elevada densidade populacional foi verificada nas rizosferas de tomate e lulo plantados no solo MS e isolados no meio JMV, com populações de 18×10^4 e 10×10^4 bactérias g^{-1} de raiz, respectivamente. De modo geral, as populações nos solos não rizosféricos para cada meio semi-sólido utilizado foram baixas quando comparadas às populações na presença de cada espécie vegetal, exceto as populações isoladas dos solos não rizosféricos ORG e HC, usando o meio JMV e JNFb, respectivamente.

Mediante a relação entre a população de microrganismos na rizosfera (R) e a população de microrganismos no solo não rizosférico (S), foi calculado o efeito rizosfera (relação R/S) de tomate e lulo nos diferentes solos (Tabela 4). Comparando as espécies vegetais observa-se que quando plantado nos solos MS e HC, o tomate apresentou um efeito rizosfera maior do que o lulo nesses mesmos solos; porém, quando plantados no solo ORG, ambas espécies vegetais apresentaram valores de efeito rizosfera próximos de 1,0, indicativos de uma baixa atividade de bactérias diazotróficas na rizosfera. Ao comparar o efeito rizosfera entre os tipos de solo em que cada espécie vegetal foi plantada, observa-se que a relação R/S do tomate plantado no solo HC e no solo MS apresentou valores semelhantes, enquanto o tomate no solo ORG não apresentou efeito rizosfera. Já o efeito rizosfera do lulo foi maior quando essa espécie vegetal foi plantada no solo MS.

Tabela 4 Efeito rizosfera (relação R/S) do tomate e do lulo no número mais provável de microrganismos (NMP) utilizando solos com diferentes tipos de manejo (mata secundária-MS, hortícola convencional-HC e orgânico-ORG).

Espécie vegetal	Tipo de solo	Rizosfera (R)	Solo não rizosférico (S)	Efeito Rizosfera R/S
		NMPx10 ⁴ células g ⁻¹		
TOMATE	MS	27,3	11,0	2,5
	HC	19,7	7,7	2,6
	ORG	15,3	18,6	0,8
LULO	MS	25,3	11,0	2,3
	HC	9,3	7,7	1,2
	ORG	24,7	18,6	1,3

Identificação e diversidade molecular dos isolados

A análise comparativa das sequências do gene 16S RNAr permitiu a identificação taxonômica dos isolados ao nível de gênero. Um total de 114 sequências foram obtidas e três isolados não puderam ser identificados já que apresentaram sequências com baixa qualidade (Tabela 5). Utilizando a classificação do RDP II “Ribossomal Database Project” com auxílio do programa “Classifier”, identificou-se que uma única sequência, relativa a uma bactéria isolada da rizosfera de lulo, pertence ao filo *Firmicutes* e as demais sequências analisadas são pertencentes ao filo *Proteobacteria*, dentre as quais, 62 encontram-se dentro da classe α -Proteobacteria, 27 na β -Proteobacteria e 24 na γ -Proteobacteria.

Todos os isolados estão distribuídos nos experimentos entre 14 gêneros diferentes: *Rhizobium* (60), *Pseudomonas* (15), *Burkholderia* (12), *Enterobacter* (6), *Variovorax* (6), *Cupriavidus* (3), *Massilia* (3), *Stenotrophomonas* (2), *Roseateles* (2), *Bacillus* (1), *Herbaspirillum* (1), *Xanthomonas* (1), *Novosphingobium* (1) e *Caulobacter* (1) (Figura 1). No experimento realizado com o solo MS houve uma maior riqueza de gêneros (9) com abundâncias relativas distribuídas uniformemente. No entanto, o uso de tomate e lulo como plantas-isca nesse mesmo solo ocasionou uma redução na riqueza de alguns gêneros e um aumento na abundância relativa de outros gêneros como *Rhizobium* e *Burkholderia*.

Observou-se um comportamento similar no experimento como o solo ORG, que com uma comunidade composta por 14 isolados distribuídos em 6 gêneros diferentes apresentou uma diminuição na riqueza quando foram plantados o tomate e o lulo; porém, houve um aumento na abundância do gênero *Rhizobium* assim como uma variação na composição da comunidade microbiana com a presença de alguns gêneros diferentes. Por outro lado, nos experimentos utilizando o solo HC observou-se um comportamento diferente, já que na presença de tomate houve uma maior riqueza de gêneros, sendo *Rhizobium* e *Pseudomonas* os gêneros comuns tanto no solo de HC como no tomate plantado no solo HC com abundâncias relativas similares (Figura 1). Já na presença do lulo, embora a riqueza seja a mesma que no solo HC, a composição da comunidade foi diferente, sendo *Rhizobium* o único gênero em comum e com uma maior abundância na presença da planta.

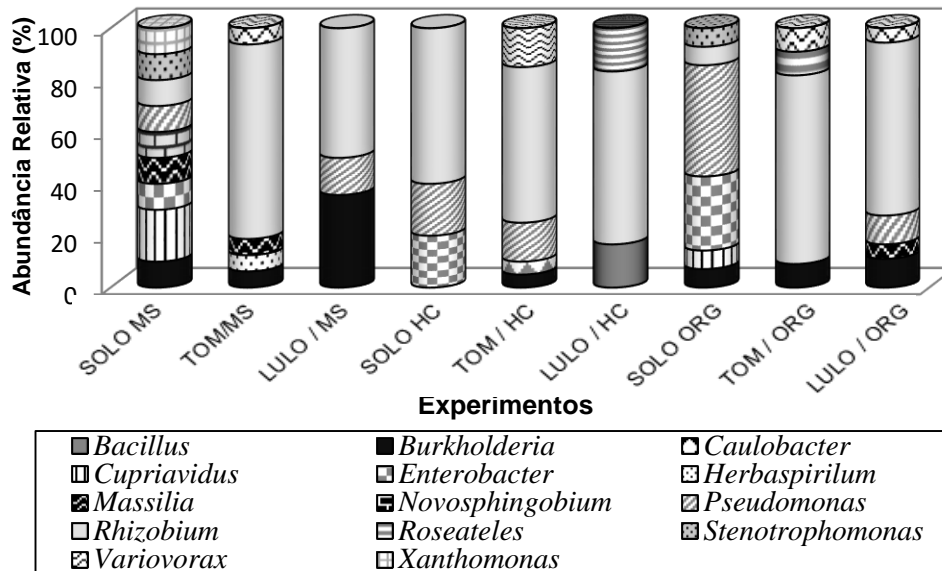
Tabela 5 Identificação taxonômica das bactérias isoladas dos solos não rizosféricos sob diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantadas nesses tipos de solos (TOMATE/MS, TOMATE/HC, TOMATE/ORG, LULO/MS, LULO/HC e LULO/ORG), conforme o resultado do sequenciamento parcial do gene 16S RNAr

Orígem	Código	Gênero	Orígem	Código	Gênero	Orígem	Código	Gênero
SOLO MS	1S	<i>Stenotrophomonas</i>	TOMATE/ MS	31T	<i>Rhizobium</i>	LULO /MS	1L	<i>Burkholderia</i>
	2S	<i>Massilia</i>		32T	<i>Rhizobium</i>		4L	NI ^a
	3S	<i>Rhizobium</i>		34T	<i>Rhizobium</i>		8L	<i>Pseudomonas</i>
	4S	<i>Xanthomonas</i>		35T	<i>Rhizobium</i>		17L	<i>Rhizobium</i>
	5S	<i>Novosphingobium</i>		36T	<i>Rhizobium</i>		18L	<i>Burkholderia</i>
	6S	<i>Enterobacter</i>		43T	<i>Rhizobium</i>		22L	<i>Rhizobium</i>
	7S	<i>Burkholderia</i>		44T	<i>Massilia</i>		23L	<i>Burkholderia</i>
	8S	<i>Cupriavidus</i>					24L	<i>Burkholderia</i>
	9S	<i>Pseudomonas</i>		4T	<i>Rhizobium</i>		27L	<i>Rhizobium</i>
	10S	<i>Cupriavidus</i>		7T	<i>Rhizobium</i>		28L	<i>Burkholderia</i>
SOLO HC	11S	<i>Rhizobium</i>	TOMATE /HC	9T	<i>Rhizobium</i>	LULO /HC	37L	<i>Rhizobium</i>
	12S	<i>Rhizobium</i>		14T	<i>Rhizobium</i>		46L	<i>Pseudomonas</i>
	13S	<i>Rhizobium</i>		17T	<i>Pseudomonas</i>		48L	<i>Rhizobium</i>
	14S	<i>Pseudomonas</i>		18T	<i>Rhizobium</i>		50L	<i>Rhizobium</i>
	15S	<i>Enterobacter</i>		19T	<i>Burkholderia</i>		52L	<i>Rhizobium</i>
SOLO ORG	16S	<i>Pseudomonas</i>	TOMATE /HC	20T	<i>Pseudomonas</i>	LULO /HC	6L	<i>Bacillus</i>
	17S	<i>Pseudomonas</i>		26T	<i>Rhizobium</i>		13L	<i>Rhizobium</i>
	18S	<i>Rhizobium</i>		29T	<i>Rhizobium</i>		29L	<i>Rhizobium</i>
	19S	<i>Enterobacter</i>		33T	<i>Rhizobium</i>		32L	<i>Rhizobium</i>
	20S	<i>Pseudomonas</i>		39T	<i>Rhizobium</i>		43L	<i>Rhizobium</i>
	21S	<i>Stenotrophomonas</i>		41T	<i>Rhizobium</i>		49L	<i>Roseateles</i>
	22S	<i>Enterobacter</i>		46T	<i>Variovorax</i>			
	23S	<i>Pseudomonas</i>		47T	<i>Caulobacter</i>		5L	<i>Pseudomonas</i>
	24S	<i>Burkholderia</i>		48T	<i>Rhizobium</i>		9L	<i>Rhizobium</i>
	25S	<i>Pseudomonas</i>		49T	<i>Pseudomonas</i>		11L	<i>Pseudomonas</i>
	26S	<i>Cupriavidus</i>		50T	<i>Rhizobium</i>		12L	<i>Rhizobium</i>
	27S	<i>Enterobacter</i>		51T	<i>Variovorax</i>		14L	<i>Rhizobium</i>
	28S	<i>Enterobacter</i>		53T	<i>Variovorax</i>		15L	<i>Burkholderia</i>
	29S	<i>Pseudomonas</i>					16L	<i>Rhizobium</i>
TOMATE /MS	3T	<i>Herbaspirillum</i>	TOMATE /ORG	1T	<i>Rhizobium</i>	LULO /ORG	19L	<i>Burkholderia</i>
	5T	<i>Variovorax</i>		2T	<i>Rhizobium</i>		20L	<i>Rhizobium</i>
	6T	<i>Rhizobium</i>		8T	<i>Rhizobium</i>		25L	<i>Massilia</i>
	12T	<i>Rhizobium</i>		10T	<i>Rhizobium</i>		26L	<i>Rhizobium</i>
	13T	NI ^a		16T	<i>Roseateles</i>		30L	<i>Variovorax</i>
	15T	<i>Rhizobium</i>		21T	<i>Rhizobium</i>		31L	<i>Rhizobium</i>
	23T	<i>Burkholderia</i>		22T	NI ^a		38L	<i>Rhizobium</i>
	24T	<i>Rhizobium</i>		25T	<i>Rhizobium</i>		39L	<i>Rhizobium</i>
	28T	<i>Rhizobium</i>		27T	<i>Rhizobium</i>		40L	<i>Rhizobium</i>
	30T	<i>Rhizobium</i>		38T	<i>Variovorax</i>		42L	<i>Rhizobium</i>
				42T	<i>Rhizobium</i>		47L	<i>Rhizobium</i>
		45T	<i>Burkholderia</i>					

^a Não identificado

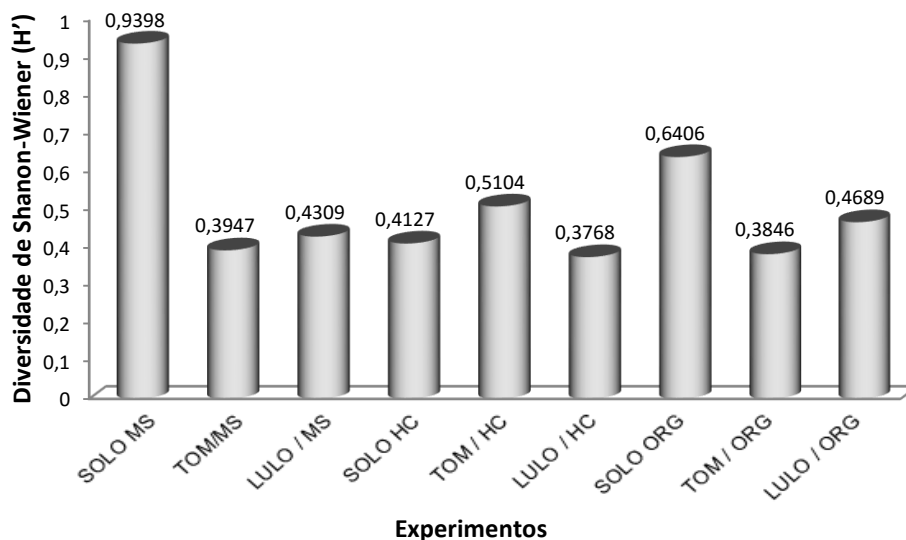
Comparando os experimentos por tipo específico de solo, foi observado que em todos os casos, a rizosfera de tomate selecionou certos grupos bacterianos que não foram observados na rizosfera do lulo e vice-versa. Do mesmo modo, ao comparar os experimentos por tipo específico de planta, observou-se que determinados gêneros bacterianos foram encontrados exclusivamente em algum dos três tipos de manejo dos solos avaliados.

Figura 1 Abundância relativa dos diferentes gêneros de bactérias diazotróficas isoladas de solos não rizosféricos sob diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantadas nesses tipos de solos (TOM/MS, TOM/HC, TOM/ORG, LULO/MS, LULO/HC e LULO/ORG), determinada pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr.



Por meio do índice de Shanon-Wiener (Figura 2), o solo não rizosférico MS foi o que apresentou a maior diversidade (0,9398), mas essa diversidade diminuiu quando foram plantados o lulo (0,4309) e o tomate (0,3947).

Figura 2 Índice de diversidade de Shanon-Wiener dos solos não rizosféricos sob diferentes tipos de manejo (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantadas nesses tipos de solos (TOM/MS, TOM/HC, TOM/ORG, LULO/MS, LULO/HC e LULO/ORG), determinado pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr



De forma similar, a diversidade no solo ORG foi maior (0,6406) que quando comparada na presença das espécies vegetais, sendo menor para o tomate (0,3846) do que para o lulo (0,4689). No caso dos experimentos com o solo HC, foi o tomate que apresentou a maior diversidade de gêneros (0,5104), seguida pelo solo não rizosférico (0,4127) e pelo lulo (0,3768).

Capacidade de promoção do crescimento vegetal

Produção de Compostos Indólicos

A capacidade de produção de compostos indólicos na presença do precursor L-triptofano foi observada em 54 dos 117 isolados (aprox. 46% dos isolados) (Figura 3a), sendo que 12 dessas bactérias foram isoladas dos três diferentes solos, 25 da rizosfera de tomate e 17 da rizosfera de lulo (Material Suplementar Tabela S1). Os isolados variaram no seu potencial para produzir indoles, e mesmo bactérias pertencentes ao mesmo gênero, produziram quantidades diferentes desses compostos indólicos em meio de cultura líquido. Os valores de produção de compostos indólicos variaram de 5,24 a 193,97 μg indoles mg^{-1} proteína para os isolados dos solos, 2,96 a 55,90 μg indoles mg^{-1} proteína para os isolados da rizosfera de tomate e 4,37 a 70,10 μg indoles mg^{-1} proteína para os isolados da rizosfera de lulo. As estirpes padrão BR11001 e BR11281 produziram 45,92 e 32,49 μg mg^{-1} , respectivamente. Dentre os isolados dos solos, aquele que apresentou um maior valor de produção de compostos indólicos foi o 15S proveniente do solo HC e identificado como sendo pertencente ao gênero *Enterobacter*. Por outro lado, as bactérias que mais produziram compostos indólicos na rizosfera de tomate e lulo foram respectivamente a 4T, proveniente do tomate plantado no solo HC e a 37L proveniente do lulo plantado no solo MS e identificados como pertencentes ao gênero *Rhizobium*.

Solubilização de fosfatos

A capacidade para solubilizar FePO_4 foi observada em 84 dos 117 isolados (aprox. 72% do total de isolados) (Figura 3b), sendo que 18 dessas bactérias foram isoladas dos solos, 42 da rizosfera de tomate e 24 da rizosfera de lulo (Material Suplementar

Tabela S2). Depois de sete dias, o pH do meio diminuiu de 7,0 até uma faixa que variou entre 3,02 até 5,50 entre todos os isolados, não havendo uma correlação ($r = -0,09$) entre a quantidade de FePO_4 solubilizado com o pH final do meio. A quantidade de FePO_4 solubilizado variou numa faixa de 1,20 até 56,00 mg P L^{-1} para as bactérias dos solos e o isolado que registrou o maior valor foi o 15S proveniente do solo HC e identificado como sendo pertencente ao gênero *Enterobacter*, apresentando uma diferença significativa com relação às outras bactérias dos solos e inclusive com as estirpes padrão BR11001 e BR11281 que solubilizaram 18,45 e 12,76 mg P L^{-1} , respectivamente. Por outro lado, a quantidade de FePO_4 solubilizado pelas bactérias da rizosfera de tomate variou numa faixa de 0,79 até 10,76 mg P L^{-1} e o maior valor foi registrado para a bactéria 39T proveniente da rizosfera de tomate plantado no solo HC e identificada como pertencente ao gênero *Rhizobium*. Porém, a quantidade de P solubilizado por essa bactéria (39T) foi menor e apresentou diferença significativa quando comparada com as estirpes padrão. Assim também, a quantidade de FePO_4 solubilizado pelas bactérias da rizosfera de lulo variou numa faixa de 0,59 até 11,39 mg P L^{-1} e o maior valor foi verificado para o isolado 23L proveniente da rizosfera de lulo plantado no solo MS e identificado como pertencente ao gênero *Burkholderia*, porém, a quantidade de P solubilizado por essa bactéria também foi significativamente menor quando comparada com as estirpes padrão.

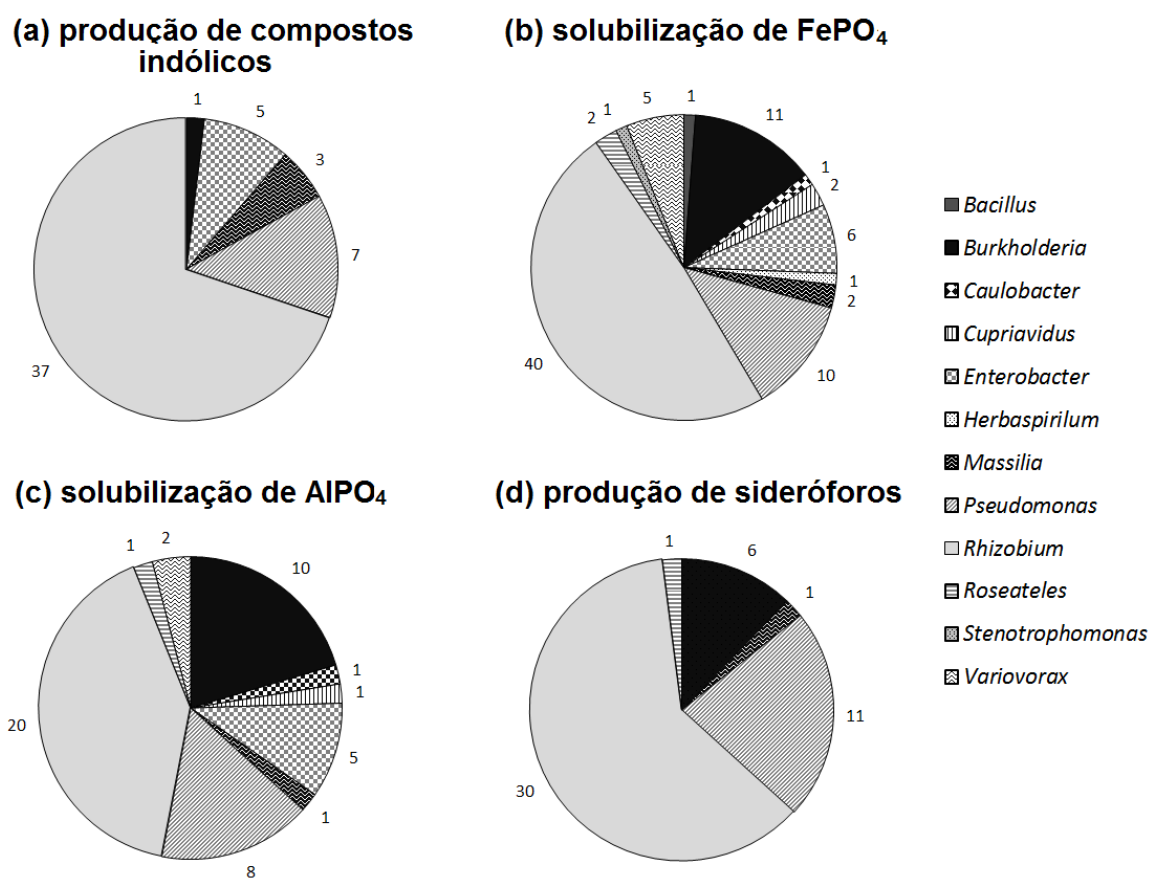
Simultaneamente, também foi avaliada a capacidade das bactérias para solubilizar AlPO_4 sendo detectada em apenas 49 dos 117 isolados (aprox. 42% do total de isolados e 1,7 vezes menos isolados que para FePO_4) (Figura 3c). Dentre as bactérias que solubilizaram AlPO_4 , 18 foram isoladas dos solos, 17 da rizosfera de tomate e 14 da rizosfera de lulo (Material Suplementar Tabela S3). Depois de sete dias, o pH do meio diminuiu de 7,0 até uma faixa que variou entre 3,18 até 5,60 entre todos os isolados, havendo uma correlação negativa ($r = -0,54$) entre a quantidade de AlPO_4 solubilizada e o pH final do meio. O isolado que registrou o maior valor de solubilização de AlPO_4 nos solos foi o mesmo isolado identificado como *Enterobacter* (15S) que melhor solubilizou FePO_4 , liberando no meio uma quantidade de P (15,32 mg P L^{-1}) significativamente maior com relação às outras bactérias dos solos e às estirpes padrão BR11001 e BR11281 que solubilizaram 9,44 e 3,63 mg P L^{-1} , respectivamente. Para os isolados da rizosfera de tomate, a solubilização de AlPO_4 variou entre 0,62 até 14,57 mg P L^{-1} e o maior valor registrado foi para a bactéria 44T

proveniente do tomate plantado no solo de mata e identificada como sendo pertencente ao gênero *Massilia*. Já os isolados da rizosfera de lulo apresentaram valores de solubilização de AlPO_4 variando na faixa entre 0,65 até 17,05 mg P L⁻¹, e a mesma bactéria do gênero *Burkholderia* (23L) que mais solubilizou FePO_4 foi também a que mais solubilizou AlPO_4 .

Produção de sideróforos

Considerando a formação de um halo claro ao redor das colônias bacterianas como um resultado positivo para a produção de sideróforos, a capacidade para produzir esses compostos foi detectada em 49 dos 117 isolados (aprox. 42% dos isolados) (Figura 3d), dos quais 12 foram bactérias isoladas dos solos, 20 da rizosfera de tomate e 17 da rizosfera de lulo (Material Suplementar Tabela S4). O índice de produção de sideróforos (IPS) para os isolados dos solos variou numa faixa de 1,4 a 2,5 e o isolado que apresentou o maior IPS foi o 29S proveniente do solo ORG e identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*. As bactérias isoladas da rizosfera de tomate apresentaram IPS que variaram na faixa de 1,1 a 2,0, sendo que o isolado 8T proveniente da rizosfera de tomate plantado no solo ORG e identificado como pertencente a gênero *Rhizobium*, foi quem apresentou o maior IPS. Por outro lado, as bactérias isoladas da rizosfera de lulo apresentaram IPS que variaram na faixa de 1,2 a 3,2, e o isolado que apresentou o maior IPS foi o 1L proveniente da rizosfera de lulo plantado no solo MS e identificado como sendo pertencente ao gênero *Burkholderia*. Para as estirpes BR11001 e BR11281 usadas como referências não foi verificada a produção de sideróforos.

Figura 3 Distribuição dos isolados obtidos conforme o posicionamento taxonômico em relação à **(a)** produção de compostos indólicos, **(b)** solubilização de FePO_4 , **(c)** solubilização de AlPO_4 , e **(d)** produção de sideróforos.



Potencial biotecnológico dos isolados

Todos os isolados foram classificados de acordo com o seu potencial biotecnológico (Material Suplementar Tabela S5) através da somatória das notas atribuídas para cada atividade promotora do crescimento vegetal apresentada por cada um dos isolados. Dentre os 117 isolados avaliados, 16 isolados (14%) apresentaram um alto potencial biotecnológico, representado por bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* que exibiram pelo menos 3 das 4 características avaliadas. 41 isolados (35%) apresentaram um potencial biotecnológico médio, 50 isolados (43%) exibiram um baixo potencial biotecnológico e só 10 (8%) isolados não apresentaram potencial como bactérias promotoras do crescimento vegetal ao não exibirem nenhuma das características avaliadas. Um

total de 25 isolados apresentaram capacidade para solubilizar fosfatos e produzir compostos indólicos e sideróforos ao mesmo tempo.

Discussão

A rizosfera é um ambiente dinâmico no qual acontece a interação solo-planta-microrganismos (Brimecombe et al. 2007). Ela é fortemente influenciada pelas plantas, que conseguem exsudar pelas raízes compostos orgânicos que representam até 11% do carbono fixado (Jones et al. 2009). Tais exsudatos radiculares são apontados como um fator determinante da estrutura da comunidade microbiana na rizosfera (Dennis et al. 2010). A proporção e composição dos exsudatos de raiz variam de acordo com a espécie e estado fisiológico da planta, idade, disponibilidade de nutrientes, tipo de solo e fatores ambientais (Bais et al. 2006). Nesse sentido, a presença de uma determinada planta no solo pode modificar a composição da comunidade microbiana na rizosfera (Bever 2003), fazendo com que a densidade da população microbiana nesse ambiente seja maior do que no solo não rizosférico, num fenômeno conhecido como efeito rizosfera (Berendsen et al. 2012). A identificação de 114 bactérias isoladas foi usada para determinar se possíveis mudanças na composição da comunidade diazotrófica foram influenciadas pelo efeito rizosfera de duas espécies de *Solanum* (*Solanum lycopersicum*, tomate e *Solanum quitoense*, lulo) plantadas em três solos com diferentes manejos (mata, horta e orgânico).

Ao calcular o efeito rizosfera de cada microcosmo foi observado um efeito decrescente para os seguintes sistemas: tomate-horta > tomate-mata > lulo-mata > lulo-orgânico > lulo-horta. Esses resultados sugerem que houve uma maior seleção de bactérias pela rizosfera de tomate do que pela rizosfera de lulo. No entanto o tomate plantado no solo orgânico não apresentou efeito rizosfera. Pandey e Palni (1996) reportaram um efeito supressivo da rizosfera de arbustos de chá sobre a comunidade de bactérias, fungos e actinomicetos, que foi atribuído à possível secreção de substâncias antimicrobianas pelas raízes do chá que inibiram a atividade microbiana. Entretanto, no presente estudo não é possível afirmar que a exsudação de substâncias antimicrobianas tenha inibindo a população bacteriana na rizosfera do tomate no solo orgânico, já que essa planta apresentou um efeito rizosfera quando plantada nos outros dois solos avaliados. Uma explicação plausível

poderia estar relacionada com o fato de que o método de isolamento utilizado foi dependente de cultivo. Tem sido relatado que menos de 1% das bactérias podem ser cultivadas em meios artificiais, já que esses são incapazes de imitar as condições bióticas e abióticas necessárias para o crescimento microbiano, ocasionando problemas relacionados com taxas de crescimento diferenciais (Pham e Kim 2012; Hirsch et al. 2010).

Adicionalmente, houve variação na composição da comunidade microbiana entre espécies vegetais em um determinado tipo de solo, já que a rizosfera de tomate selecionou certos grupos bacterianos que não foram observados na rizosfera do lulo e vice-versa. Do mesmo modo também foi observada uma variação entre os diferentes solos avaliados considerando uma determinada espécie vegetal, já que certos gêneros bacterianos presentes no solo MS, não foram observados no solo HC nem no solo ORG e vice-versa. Além disso, *Rhizobium* foi o único gênero selecionado em todos os experimentos, independentemente da espécie vegetal e do tipo de solo. Nesse sentido, o presente estudo indicou que tanto a espécie vegetal como o tipo de solo exerceram um efeito sobre a densidade e a composição da comunidade microbiana associada ao tomate e lulo, porém, a espécie vegetal foi o fator mais dominante. De acordo com Zak et al. (2003) a quantidade e qualidade de exsudatos liberados pelas raízes variam de acordo com a espécie de planta já que cada espécie difere na sua composição bioquímica, controlando a estrutura e função das comunidades microbianas do solo e da rizosfera. Vários estudos relataram que a espécie da planta, em vez do tipo de solo, teve o maior impacto na comunidade microbiana da rizosfera (Wieland et al. 2001; Berg et al. 2002; Kowalchuk et al. 2002; Costa et al. 2006). No entanto, o tipo de solo foi considerado o fator determinante em outros estudos (Latour et al. 1996; Horwath et al. 1998; Salles et al. 2004). Foi ainda demonstrado que mesmo dentro das espécies, diferentes genótipos podem desenvolver comunidades microbianas distintas na rizosfera, o que sugere que as plantas são capazes de moldar a composição da microbiota nesse microambiente (Micallef et al. 2009; Berendsen et al. 2012). Segundo Garbeva et al. (2004), o fato de que em algumas situações o solo e, em outras, a espécie de planta seja o fator determinante que afeta à comunidade microbiana do solo, pode estar relacionado com interações microbianas complexas no solo, associadas com as características dos exsudatos liberados, características físico-químicas dos solos e inclusive, as práticas de manejo.

Considerando que os meios semi-sólidos livres de nitrogênio foram usados como uma estratégia para selecionar bactérias diazotróficas e que o meio JMV foi o que permitiu a obtenção de um maior número de isolados neste estudo; esses meios, na realidade, não possibilitaram exclusivamente o isolamento dos gêneros de bactérias diazotróficas para os quais foram recomendados. De fato, mesmo com a formação da película característica na superfície do meio semi-sólido livre de nitrogênio, tem sido revelada a ocorrência de bactérias não diazotróficas junto com diazotróficas em estudos utilizando esses meios. Barraquio et al. (1997), usaram vários meios deficientes em nitrogênio para isolar bactérias endofíticas de diversas variedades de arroz esterilizadas superficialmente e encontraram que aproximadamente 90% das bactérias não eram diazotróficas. Farina et al. (2012) utilizaram os meios NFb, LGI e LGI-P livres de nitrogênio para avaliar a comunidade de bactérias associadas ao solo, rizosfera e raízes de canola em diferentes estágios de desenvolvimento e encontraram que *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* foram os gêneros mais abundantes.

Pelo índice de Shannon-Wiener (H'), foi possível observar que a diversidade da comunidade bacteriana na rizosfera de tomate e lulo foi menor que a diversidade de cada um dos solos. No entanto, mesmo com uma redução da diversidade e riqueza na rizosfera de cada espécie vegetal, foi encontrado um aumento da abundância relativa de alguns gêneros bacterianos e que a densidade total de bactérias diazotróficas na rizosfera de tomate e lulo plantados em cada solo foi maior que a dos solos não rizosféricos. Grayston et al. 1998, reportaram que a proporção de espécies de *Pseudomonas* na população bacteriana total incrementou de 0.01% no solo não rizosférico a 12.5% na rizosfera das plantas avaliadas. Tem sido descrito que o fornecimento contínuo de nutrientes através dos exsudatos radiculares permite o estabelecimento de um ambiente dinâmico, onde o número total de bactérias na rizosfera das plantas é maior do que em solos não rizosféricos (Dennis et al. 2010; García-Salamanca et al. 2012). Além disso, esses mesmos exsudatos liberados pelas raízes permitem a seleção de microrganismos específicos, fazendo com que as comunidades microbianas da rizosfera sejam menos diversas do que as dos solos não rizosféricos (Berendsen et al. 2012).

Foram identificados 14 gêneros bacterianos diferentes (99% pertencentes ao filo *Proteobacteria*), predominando *Rhizobium*, *Variovorax*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*, abrangendo cerca de 85% das bactérias associadas

aos solos e à rizosfera de tomate e lulo. Kim et al. (2006) encontraram que ao redor de 50% da comunidade microbiana associada ao solo, rizosfera e raízes de tomate pertenciam às classes α -, β - e γ -Proteobacteria. Uma análise da comunidade endofítica bacteriana em folhas de tomate pelo pirosequenciamento do gene 16S RNAr foi realizada por Romero et al. (2014), e encontraram que 90% da comunidade estava formada por representantes do filo *Proteobacteria*. Caballero-Mellado et al. (2007) encontraram várias espécies de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* na rizosfera e rizoplano de tomate incluindo espécies como *B. tropica*, *B. unamae* e *B. xenovorans*. *Pseudomonas* é um dos mais diversos gêneros, compreendendo membros metabolicamente versáteis conhecidos por ocupar numerosos nichos ecológicos, como o solo e a rizosfera de muitas plantas (Jun et al. 2015) incluindo o tomate. Lemanceau et al. (1995) encontraram que espécies de *P. fluorescens* e *P. putida* foram as mais prevalentes em amostras de solo, rizosfera e rizoplano de tomate. Pastor et al. (2012) e Hammami et al. (2013) avaliaram a capacidade antagonista de *P. fluorescens* isoladas da rizosfera de tomate contra fungos fitopatogênicos obtendo resultados promissores.

De modo geral, *Rhizobium* foi o gênero bacteriano mais abundante (53% do total de isolados) identificado na rizosfera de tomate, de lulo e no solo hortícola convencional e foi também o único encontrado em todos os experimentos neste estudo, independentemente da espécie vegetal. Bactérias pertencentes a esse gênero são bem conhecidas pela sua capacidade de estabelecer uma relação simbiótica com plantas leguminosas induzindo a formação de nódulos onde ocorre a fixação de nitrogênio (Willems 2006). Contudo, nos últimos anos vários trabalhos têm demonstrado que estirpes de *Rhizobium* podem se associar com plantas não leguminosas sem a formação de nódulos e têm potencial para serem usadas como BPCV (Singh et al. 2005; Mehboob et al. 2009). Por exemplo, *Rhizobium* tem sido descrito associado principalmente com arroz (Yanni et al. 1997; Peng et al. 2008), mas também tem sido relatado associado a plantas como rabanete (Antoun et al. 1998), milho (Chabot et al. 1996;), morango (Costa et al. 2006), batata doce (Reiter et al. 2003), girassol (Ambrosini et al. 2012), alface (Noel et al. 1996) e batata (Turnbull et al. 2012). Porém, a colonização da rizosfera de tomate por *Rhizobium* tem sido pouco relatada. Kim et al. (2006) ao caracterizarem a comunidade bacteriana associada ao solo, rizosfera e raízes de tomate, encontraram que de um total de 68 clones, dois deles pertenciam à ordem *Rhizobiales*, especificamente

associados as raízes dessa planta. Outro estudo realizado por Romero et al. (2014) analisando a comunidade bacteriana endofítica associada à rizosfera e folhas de tomate observaram que dos mais de 3400 OTUs obtidos, 4 deles pertenciam à ordem *Rhizobiales*. Já uma pesquisa recente realizada por Ottesen et al. (2013) mostrou que ao analisar a comunidade microbiana presente em diversos órgãos dessa planta como as folhas, caules, raízes, flores e frutos, distintos agrupamentos de comunidades microbianas foram associados com os diferentes órgãos e representantes da família *Rhizobiaceae* foram encontrados em todos eles. No entanto, a alta abundância de estirpes de *Rhizobium* encontradas associadas às duas solanáceas neste estudo, poderia também ser explicada devido ao fato de que os solos usados foram obtidos de uma fazenda experimental onde a rotação de culturas com diversas plantas, incluindo leguminosas, é comum. Um fenômeno similar foi reportado por Reiter et al. 2003, que ao avaliarem a comunidade endofítica diazotrófica associada ao caule e tubérculo de sete cultivares de batata doce, uma planta que como o tomate e lulo pertence à ordem *Solanales*, encontraram que ao redor de 50% das sequências do gene *nifH* eram relativas ao gênero *Rhizobium* e outros gêneros do filo α -Proteobacteria. Porém, eles também relataram que as plantas de batata doce usadas no estudo foram obtidas a partir de pequenos campos com rotação de culturas com leguminosas.

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) podem promover o crescimento e a produtividade das plantas por mecanismos diretos ou indiretos (Ortiz-Castro et al. 2009) através da disponibilização de nutrientes ou pela produção de compostos que estimulam o crescimento ou têm atividade antagonista contra fitopatógenos (Van Loon 2007; Glick et al. 2007). Uma bactéria em particular pode utilizar um ou mais destes mecanismos ou pode atuar sinergicamente com outros microrganismos para estimular o crescimento da planta hospedeira (Vessey 2003). Além disso, uma bactéria pode proporcionar benefícios diferentes em vários momentos durante o ciclo de vida da planta (Glick 2005). Tem sido relatado que a produção de compostos indólicos (fitormônios) como auxinas e giberelinas desempenham um papel importante no aumento da área superficial da raiz assim como no incremento do número de raízes laterais, resultando numa maior capacidade da planta para absorver os nutrientes do solo (Bhattacharyya e Jha 2012; Cassán et al. 2013). Neste trabalho, a capacidade de produção de compostos indólicos na presença do precursor L-triptofano foi observada em aproximadamente

46% dos isolados e as quantidades produzidas foram diferentes entre bactérias do mesmo gênero. Farina et al. (2012) mostraram que a produção de compostos indólicos variou entre estirpes pertencentes ao mesmo gênero tais como *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Mirza et al. (2001) relataram que a produção de auxinas por bactérias pode variar entre diferentes espécies e estirpes da mesma espécie e que também é influenciada pelas condições de cultivo, fase de crescimento e disponibilidade do substrato. Por outro lado, não é possível determinar, com base na concentração de compostos indólicos produzidos, se as estirpes de *Enterobacter* e *Rhizobium* que exibiram uma maior produção de índoles no presente estudo, realmente poderiam influenciar positivamente no crescimento do tomate ou lulo. Tem sido demonstrado que diferentes concentrações de auxinas podem afetar a fisiologia das plantas em formas diferentes, estimulando ou suprimindo o seu crescimento, já que os níveis endógenos de auxinas na planta podem ser alterados por influência dos compostos indólicos que foram secretados pelas bactérias da rizosfera (Glick 2012).

Vários grupos microbianos da rizosfera são conhecidos pela sua capacidade para solubilizar fosfatos através da secreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e fosfatases que facilitam a conversão de formas insolúveis de P para formas disponíveis para as plantas (Richardson et al. 2009). Em solos tropicais, fosfatos inorgânicos são encontrados principalmente nas formas de fosfato de cálcio, ferro e alumínio (Reyes et al. 1999). No presente estudo, 84 isolados (72%) foram capazes de solubilizar FePO_4 , porém não houve uma correlação entre o pH final e a quantidade de FePO_4 dissolvido. Isto coincide com o relatado por Subba Rao (1982) quem afirmou que a acidificação do meio não parece ser o único mecanismo de solubilização de P, logo a capacidade de reduzir o pH, em alguns casos, não se correlaciona com a capacidade de solubilizar fosfatos minerais. No entanto, 49 isolados (42%) solubilizaram AlPO_4 sendo observada uma correlação negativa entre a solubilização desse fosfato e o pH final do meio, sugerindo que a redução do pH pode ter sido um dos mecanismos envolvidos na solubilização deste tipo de fosfato. Tem sido relatado que a solubilização de fosfatos ocorre principalmente pela produção de ácidos orgânicos através da redução do pH ou pelo aumento da quelatção dos cátions ligados ao P, ou ainda através da formação de complexos solúveis com os íons metálicos associados com o fosfato insolúvel (Ca, Al, Fe) liberando assim o P no meio (Sharma et al. 2013). Também foi observado neste

estudo que alguns gêneros de microrganismos que solubilizaram FePO_4 não solubilizaram AlPO_4 (Figura 3b e 3c) assim como houve diferenças na capacidade de um mesmo isolado em solubilizar cada um desses fosfatos, apresentando uma melhor solubilização do FePO_4 que do AlPO_4 . Mendes et al. (2014) avaliaram os mecanismos de solubilização de cinco diferentes fontes de fosfatos (AlPO_4 , FePO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Araxá e Catalão) por fungos e observaram que isolados de uma mesma espécie, tais como *A. niger*, *P. islandicum* e *P. purpurogenum*, apresentaram diferenças na sua capacidade para solubilizar esses fosfatos e que a produção de ácidos orgânicos foi o principal mecanismo para solubilizar o P do FePO_4 e do AlPO_4 . Nesse sentido, o uso de fontes de fosfato diferentes pode influenciar no padrão de crescimento do microrganismo e na quantidade e composição dos ácidos orgânicos liberados, o que conduz a uma variação na quantidade de fosfato solubilizado (Reyes et al. 1999).

Outro importante mecanismo de promoção do crescimento que pode influenciar indiretamente no crescimento das plantas é a produção de sideróforos (Ahmad et al. 2008). Vários microrganismos da rizosfera produzem sideróforos, compostos quelantes de baixo peso molecular, excretados sob condições de deficiência de ferro, que podem auxiliar no crescimento da planta na medida que aumentam a disponibilidade de ferro e controlam indiretamente os agentes patógenos da vizinhança pela limitação desse micronutriente (Neilands 1995; Silva-Stenico et al. 2005). No presente estudo, 49 isolados (42%) foram capazes de produzir sideróforos e isolados pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Burkholderia* foram os que mais produziram esses compostos. Sharma e Johri (2003) demonstraram que em condições de deficiência de ferro, duas estirpes de *Pseudomonas* que revelaram altos índices de produção de sideróforos, produziram um aumento significativo na porcentagem de germinação e crescimento de milho, assim como também apresentaram atividade antagonista contra vários fungos fitopatogênicos. Outros estudos também têm demonstrado a promoção do crescimento e capacidade de biocontrole, associada à produção de sideróforos por estirpes desses três gêneros bacterianos (Berraho et al. 1997; Bevivino et al. 1998; Arora et al. 2001; Santos-Villalobos et al. 2012).

Com a finalidade de selecionar potenciais bactérias colonizadoras da rizosfera de plantas solanáceas, todos os isolados foram classificados de acordo com o seu potencial biotecnológico (Material Suplementar Tabela S5). Entre as 117 bacterias

isoladas dos solos não rizosféricos e da rizosfera de tomate e lulo, 14% apresentaram um alto potencial e foram identificadas como sendo pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, apresentando pelo menos três das quatro características avaliadas com altas notas de atividade. No entanto, um total de 25 isolados (21%) foram capazes de solubilizar pelo menos um dos fosfatos testados, assim como produzir compostos indólicos e sideróforos ao mesmo tempo. Souza et al. (2013) reportaram que dos 336 isolados obtidos da rizosfera e raízes de plantas de arroz, 96 (28%) foram capazes de produzir auxinas, sideróforos e solubilizar fosfatos, sendo representados principalmente por estirpes dos gêneros *Burkholderia* e *Enterobacter*. Semelhantemente, Ambrosini et al. (2013) isolaram 299 bactérias das raízes e rizosfera de girassol e encontraram que 8% dos isolados, a maioria sendo pertencentes ao gênero *Burkholderia*, mostraram-se capazes de produzir auxinas, sideróforos e solubilizar fosfato de cálcio. Tem sido reportado que bactérias isoladas do solo e da rizosfera podem exibir mais de dois ou três características que podem promover o crescimento das plantas diretamente, indiretamente ou mesmo sinergicamente (Joseph et al. 2007; Ahmad et al. 2008). No entanto, em vista de que os gêneros *Burkholderia* e *Enterobacter* pertencem a famílias que contém várias espécies de bactérias patógenas oportunistas que representam um risco significativo para a saúde humana, o desenvolvimento de possíveis formulações biofertilizantes para a cultura do tomate contendo estirpes destes dois gêneros não deve ser justificado, já que a diversidade bacteriana no solo e na rizosfera é enorme sendo possível o uso de bactérias que não representem riscos para os consumidores nem para as pessoas que as manipulam durante a fabricação (Fuentes-Ramirez e Caballero-Mellado 2005; García-Fraile et al. 2012).

Adicionalmente, é a primeira vez que tem sido estudada a comunidade diazotrófica associada à rizosfera de lulo. Gonzalez e Osório (2008) observaram que o fungo micorrízico *G. aggregatum* aumentou a absorção de fósforo e a produção da biomassa de plantas de lulo inoculadas com esse fungo em condições de estufa. Por outro lado, Ochoa et al. (2001) reportaram que agricultores da Colômbia e do Equador, países centro de origem dessa cultura, tem abandonado a produção de lulo devido à doença da murcha vascular causada principalmente pelo fungo *Fusarium oxysporium*. Nesse sentido, o estudo das comunidades microbianas do solo e da rizosfera de plantas que possam identificar espécies de microrganismos

capazes de melhorar o crescimento e aumentar a resistência às doenças na cultura do lulo podem ser altamente promissores.

Conclusões

Vários fatores podem exercer influência sobre o efeito rizosfera e as interações entre plantas e microrganismos, modulando as populações e composição das comunidades microbianas nesse ambiente. Tanto a espécie de planta como o tipo de manejo do solo são determinantes para o estabelecimento e sobrevivência dos microrganismos na rizosfera. Neste estudo, o efeito rizosfera diminuiu a diversidade de bactérias diazotróficas associadas ao tomate e lulo, mas aumentou as populações de determinados gêneros bacterianos, principalmente *Rhizobium*. Entretanto, houve uma maior seleção de bactérias pela rizosfera de tomate do que pela rizosfera de lulo. *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* foram os gêneros mais abundantes e várias dessas bactérias conseguiram produzir compostos indólicos, sideróforos e solubilizar fosfatos, sugerindo que esses microrganismos têm potencial para promover o crescimento de plantas de tomate e lulo, e algumas dessas estirpes podem ser testadas em futuros experimentos de inoculação em campo com o objetivo de desenvolver um biofertilizante viável para a cultura de tomate. Adicionalmente, este estudo foi o primeiro a reportar a composição da comunidade diazotrófica bacteriana associada à rizosfera de lulo.

Agradecimentos

Ao suporte financeiro oferecido pelo CNPq e CAPES pelas bolsas de estudo oferecidas.

Referências

- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173-181
- Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, Pinheiro FG, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Plant Soil* 356:245–264
- Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria

- on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* 204:57–67
- Antoun H, Prévost D (2005) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui ZA (Ed.) *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Netherlands, pp 1-38
- Arora NK, Kang SC, Maheshwari DK (2001) Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Curr Sci* 81(6):663–677
- Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fert Soils* 30:485-491
- Barraquio WL, Revilla L, Ladha JK (1997) Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194:15–24
- Bashan Y (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech Adv* 16:729-770
- Bashan LE, Holguin G, Glick BR, Bashan Y (2007) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: Ferrera, R, Alarcon A (Eds.) *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. Editorial Trillas, México, pp 170-224
- Bais HP, Weir TL, Perry JG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233-66
- Bautista LXC, Gallardo IR (2008) Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, p 117.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PA (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17:478-486
- Berg G, Roskot N, Steidle A, Eberl L, Zock A, Smalla K (2002) Plant-Dependent Genotypic and Phenotypic Diversity of Antagonistic Rhizobacteria Isolated from Different *Verticillium* Host Plants. *Appl Environ Microbiol* 68(7): 3328–3338
- Berraho EL, Lesueur D, Diem HG, Sasson A (1997) Iron requirement and siderophore production in *Rhizobium ciceri* during growth on an iron-deficient médium. *World J Microbiol Biotech* 13:501–510
- Bever JD (2003) Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytol* 157:465–473
- Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastri C, Tabacchioni S, Cantale C, Chiarini C (1998) Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol Ecol* 27(3): 225–237
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1327–1350
- Bradford MMA (1976) Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brimecombe MJ, de Leij FAAM, Lynch JM (2007) Rhizodeposition and Microbial Populations. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (Eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, CRC Press, pp 73–109

- Bringhurst RM, Cardon ZG, Gage DJ (2001) Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. PNAS 98:4540–4545
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, de los Santos PE, Martínez-Aguilar L (2007) The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. Appl Env Microbiol 73: 5308–5319
- Canteri MG, Althaus RA, das Virgens JS, Giglioti EA, Godoy CV (2001) Sasm-agri - sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos scott-knott, tukey e duncan. Rev Bras Agrocomp 1:18-24
- Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. J Plant Growth Regul 33:440–459
- Chabot R, Antoun H, Cescas MP (1996) Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar, phaseoli. Plant Soil 184:311-321
- Cheng HR, Jiang N (2006) Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnol Lett 28:55–59
- Chowdhury N, Marschner P, Burns RG (2011) Soil microbial activity and community composition: Impact of changes in matrix and osmotic potential. Soil Biol Biochem 43:1229-1236
- Costa R, Gotz M, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G, Smalla K (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. FEMS Microbiol Ecol 56:236–249
- Cruz LM, Souza EM, Weber OB, Baldani JI, Döbereiner J, Pedrosa FO (2001) 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*musa* spp.) and pineapple (*ananas comosus* (L.) Merrill). Appl Environ Microbiol 67: 2375-2379
- Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?. FEMS Microbiol Ecol 72:313–327
- Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: embrapa-spi 60 p
- Farina R, Beneduzi A, Ambrosini A, de Campos SB, Lisboa BB, Wendisch V, Vargas LK, Passaglia LMP (2012) Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. Appl Soil Ecol 55:44–52
- Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. PNAS 103:626-631
- Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J (2005) Bacterial biofertilizers. In: Siddiqui ZA (Ed.) PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Springer, Netherlands, pp 143-172
- Gamalero E, Glick BR (2011) Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In: Maheshwari DK (Ed.) Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management, Springer, Berlin, pp 17-46
- Garbeva P, Van Veen J, Van Elsas JD (2004) Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annu Rev Phyto 42:243–270

- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Fernandez MT, Mateos PF, Rivas R, Igual JM, Martínez-Molina E, Peix A, Velazquez E (2012) Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLOS ONE* 7(5):e38122
- García-Salamanca A, Molina-Henares MA, van Dillewijn P, Solano J, Pizarro-Tobías P, Roca A, Duque E, Ramos JL (2012) Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microb Biotechnol* 6(1):36-44
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109-117
- Glick B (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett* 251:1-7
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B (2007) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit Rev Plant Sci* 26:227-242
- Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119(3):329-339
- Glick B (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica* 2012:1-15
- Gonzalez, O, Osorio, W (2008) Determination Of Mycorrhizal Dependency Of Lulo. *Acta Biol Colomb* 13:163-173
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD, Edwards AC (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 30(3):369-378
- Groffman PM, Hanson CC, Kiviat E, Stevens G (1996) Variation in microbial biomass and activity in four different wetland types. *Soil Sci Soc Am J* 60:622-629
- Hammamia I, Hsouna AB, Hamdi N, Gdoura R, Triki MA (2013) Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. *C R Biol* 336:557-564
- Hirsch, PR, Mauchline TH, Clark IM (2010) Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biol Biochem* 42:878-887
- Horwath WR, Elliott LF, Lynch JM (1998) Influence of soil quality on the function of inhibitory rhizobacteria. *Lett Appl Microbiol* 26:87-92
- Ibekwe AM, Poss JÁ, Grattan SR, Grieve CM, Suarez D (2010) Bacterial diversity in cucumber (*Cucumis sativus*) rhizosphere in response to salinity, soil pH, and boron. *Soil Biol Biochem* 42:567-575
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil* 321:5-33
- Joseph B, Patra RR, Lawrence R (2007) Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int J Plant Prod* 2:141-152
- Jun SR, Wassenaar TM, Nookaew I, Hauser L, Wanchai V, Land M, Timm C, Lu TYS, Schadt CW, Doktycz MJ, Pelletier DA, Ussery DW (2015) Comparative genome analysis of Pseudomonas genomes including Populus-associated isolates. *Appl Environ Microbiol* doi:10.1128/AEM.02612-15
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol Biochem* 36:1229-1244

- Kim JS, Dungan RS, Kwon SW, Weon HY (2006) The community composition of root-associated bacteria of the tomato plant. *World J Microbiol Biotechnol* 22:1267–1273
- Kowalchuk GA, Buma DS, Boer W, Klinkhamer PGL, van Veen J (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Ant van Leeuwenhoek* 81:509–520
- Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol Res* 167:493–499
- Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P (1996) The Composition of Fluorescent *Pseudomonad* Populations Associated with Roots Is Influenced by Plant and Soil Type. *Appl Environ Microbiol* 62:2449–2456
- Lemanceau P, Corberand T, Gardan L, Latour X, Laguerre G, Boeufgras JM, Alabouvette C (1995) Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of Fluorescent *Pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol* 61:1004–1012
- Lynch JM (1990) Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. In: Lynch JM (Ed.) *The Rhizosphere*, Wiley and Sons, pp. 1-10
- Maidak ML, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, McCaughey MJ, Woese CR (1997) The RDP (ribosomal database project). *Nucleic Acids res* 25:109-111
- Marschner P, Yang CH, Lieberei R, Crowley DE (2001) Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 33:1437-1445
- Mehboob I, Naveed M, Zahir ZA (2009) Rhizobial association with non-legumes: mechanisms and applications. *Crit Rev Plant Sci*, 28:432–456
- Mehnaz S (2015) *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. In: Arora NK (Ed.) *Plant microbes symbiosis: Applied Facets*, Springer, India, pp 297-313
- Mendes GO, Freitas ALM, Pereira OL, Silva IR, Vassilev NB, Costa MD (2014) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Ann Microbiol* 64(1):239-249
- Metha S, Nautiyal CS (2001) An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr Microbiol* 43:51–56
- Micallef SA, Shiaris MP, Colon-Carmona A (2009) Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J Exp Bot* 60:1729–1742
- Mirza MS, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Normand P, Malik KA (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237:47–54
- Murphy J, Riley JPA (1962) Modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chem Acta* 27:31-36
- Neilands JB (1995) Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270:26723-26723
- Noel ITC, Sheng C, Yost CK, Pharis RP, Hynes MF (1996) *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can J Microbiol* 42: 279-283
- Ochoa JC, Yangari B, Galarza V, Fiallos J, Ellis MA (2001) Vascular wilt of common naranjilla (*Solanum quitoense*) caused by *Fusarium oxysporum* in Ecuador. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2001-0918-01-HN

- Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4:701-712
- Ottesen AR, Peña AG, White JR, Pettengill JB, Li C, Allard S, Rideout S, Allard M, Hill T, Evans P, Strain E, Musser S, Knight R, Brown E (2013) Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiol* 2013, 13:114
- Pandey A, Palni LMS (1996) The rhizosphere effect of tea on soil microbes in a Himalayan monsoonal location. *Biol Fertil Soils* 21:131-137
- Pastor N, Carlier E, Andrés J, Rosas SB, Rovera M (2012) Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *J Environ Manage* 95:S332–S337
- Payne SM (1994) Detection, isolation and characterization of siderophores. *Methods Enzymol* 235:329–344
- Peng G, Yuan Q, Li H, Zhang W, Tan Z (2008) *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2158–2163
- Perret X, Broughton WJ (1998) Rapid identification of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. *Plant Soil* 204:21–34
- Pham VHT, Kim J (2012) Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotech* 30(9):475-484
- Reiter B, Bürgmann H, Burg K, Sessitsch A (2003) Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. *Can J Microbiol* 49:549–555
- Reyes I, Bernier L, Simard RR, Antoun H (1999) Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiol Ecol* 28:281–290
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339
- Rodrigues WC (2015) DivEs - Diversidade de espécies v3.0 - guia do usuário. *Entomologistas do Brasil*, p 33
- Romero FM, Marina M, Pieckenstain FL (2014) The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene Pyrosequencing. *FEMS Microbiol Lett* 351:187–194
- Salles JF, Van Elsas JD, Van Veen JA (2004) Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. *Appl Environ Microbiol* 70:4012–4020
- Santos-Villalobos S, Barrera-Galicia GC, Miranda-Salcedo MA, Peña-Cabriales JJ (2012) *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2615–2623
- Sarwar M, Kremer RJ (1995) Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett Appl Microbiol* 20:202-205
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47-56
- Sharma A, Johri BN (2003) Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiol Res* 158:243–248
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2(587):1–14

- Silva-Stenico ME, Pacheco FLH, Rodrigues JLM, Carrilho E, Tsai SM (2005) Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiol Res* 160:429–436
- Singh RK, Mishra RPN, Jaiswal HK (2005) Role of rhizobial endophytes as nitrogen fixer in promoting plant growth and productivity of indian cultivated upland rice (*Oryza sativa* L.) plants. In: Wang YP, Lin M, Tian ZX, Elmerich C, Newton WE (Eds.) *Biological Nitrogen Fixation, Sustainable Agriculture and the Environment*, Springer, Netherlands, pp. 289-291
- Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, da Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R, Passaglia LMP (2013) The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and Soil* 366:585-603
- Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microb Ver* 24:487-506
- SubbaRao NS (1982) *Advances in agricultural microbiology*. Oxford IBH Publications Company, India, pp 229–305
- Turnbull AL, Liu Y, Lazarovits G (2012) Isolation of bacteria from the rhizosphere and rhizoplane of potato (*Solanum tuberosum*) grown in two distinct soils using semi selective media and characterization of their biological properties. *Am. J. Pot Res* 89:294–305
- Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243–254
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586
- Wieland G, Numann R, Backhaus H (2001) Variation of Microbial Communities in Soil, Rhizosphere, and Rhizoplane in Response to Crop Species, Soil Type, and Crop Development. *Appl Environ Microbiol* 67:5849–5854
- Willems A (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287:3–14
- Yanni YG, Rizk RY, Corich V, Squartini A, Ninke K, Philip-Hollingsworth S, Orgambide G, de Bruijn F, Stoltzfus J, Buckley D, Schmidt TM, Mateos PF, Ladha JK, Dazzo FB (1997) Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194:99–114
- Yevdokimov IV (2013) Dynamics of the Rhizosphere Effect in Soils. *Euras Soil Sci* 46:676–684
- Young JPW, Downer HI, Eardly BD (1991) Phylogeny of the phototrophic *rhizobium* strain btai1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16s rRNA gene segment. *J Bacteriol* 173:2271–2277
- Zahir ZA, Arshad M, Frankenberger WT (2004) Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Adv agron* 81:97-168
- Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilman D (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?. *Ecology* 84(8): 2042–2050

Material Suplementar

Tabela S1 Concentração de indoles em cultivos de diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por 48 horas em meio líquido contendo 100 µg mL⁻¹ de triptofano.

Experimento ^d	Isolado	CI (µg mL ⁻¹)	Proteína (mg mL ⁻¹)	CI / Proteína (µg mg ⁻¹)	Experimento ^d	Isolado	CI (µg mL ⁻¹)	Proteína (mg mL ⁻¹)	CI / Proteína (µg mg ⁻¹)	
SOLOS ^a	15S	97,82	0,50	193,97 ± 2,08 a	TOMATE ^b / SOLOS	9T	5,20	0,42	12,26 ± 0,70 j	
	22S	79,08	0,57	137,49 ± 1,93 b		34T	3,47	0,30	11,51 ± 1,01 j	
	27S	72,48	0,57	128,18 ± 1,12 c		10T	4,45	0,39	11,43 ± 1,00 j	
	19S	67,65	0,53	128,23 ± 1,90 c		17T	2,79	0,33	8,55 ± 0,83 k	
	28S	48,91	0,56	87,95 ± 1,20 d		27T	2,52	0,34	7,51 ± 0,23 k	
	BR11001	38,54	0,84	45,92 ± 1,50 e		49T	2,83	0,40	7,15 ± 0,40 k	
	11S	28,62	0,67	42,79 ± 0,56 f		42T	2,43	0,36	6,65 ± 1,52 k	
	BR11281	22,20	0,68	32,49 ± 1,73 g		29T	1,77	0,39	4,54 ± 0,23 l	
	13S	12,26	0,47	26,03 ± 1,16 h		25T	1,65	0,45	3,65 ± 0,21 l	
	18S	9,51	0,37	25,73 ± 0,73 h		20T	1,57	0,52	2,97 ± 0,43 l	
	12S	7,37	0,35	21,41 ± 1,42 i		26T	1,19	0,40	2,96 ± 0,08 l	
	9S	5,88	0,40	14,73 ± 0,76 j						
	2S	3,29	0,23	14,05 ± 0,44 j						
14S	2,12	0,40	5,24 ± 0,29 k							
TOMATE ^b / SOLOS	4T	23,76	0,43	55,90 ± 0,68 a	LULO ^c / SOLOS	37L	27,03	0,39	70,10 ± 1,36 a	
	35T	13,50	0,25	53,50 ± 1,99 b		50L	21,33	0,43	49,68 ± 0,91 b	
	41T	20,13	0,39	51,13 ± 1,60 c		BR11001	38,54	0,84	45,92 ± 1,50 c	
	BR11001	38,54	0,84	45,92 ± 1,50 d		39L	25,78	0,63	40,97 ± 1,38 d	
	14T	15,12	0,46	33,10 ± 0,98 e		22L	21,75	0,61	35,74 ± 1,44 e	
	BR11281	22,20	0,68	32,49 ± 1,73 e		BR11281	22,20	0,68	32,49 ± 1,73 f	
	13T	10,40	0,37	27,79 ± 1,12 f		14L	10,76	0,35	30,31 ± 1,13 f	
	48T	10,41	0,35	29,77 ± 1,38 f		43L	16,99	0,62	27,27 ± 1,77 g	
	8T	11,87	0,43	27,62 ± 0,65 f		27L	12,31	0,45	27,26 ± 1,40 g	
	44T	2,35	0,11	21,83 ± 0,64 g		52L	7,46	0,31	24,41 ± 1,48 h	
	7T	8,07	0,38	20,94 ± 1,16 g		17L	6,37	0,31	20,34 ± 0,08 i	
	43T	6,31	0,34	18,50 ± 1,71 h		29L	6,54	0,33	19,64 ± 2,00 i	
	2T	5,85	0,39	15,01 ± 0,68 i		25L	2,00	0,13	14,86 ± 0,40 j	
	1T	5,64	0,39	14,52 ± 0,33 i		11L	2,06	0,19	10,98 ± 0,99 k	
	21T	5,75	0,40	14,42 ± 1,88 i		5L	3,72	0,35	10,74 ± 0,26 k	
	50T	3,72	0,29	12,62 ± 0,41 j		47L	2,86	0,39	7,31 ± 1,01 l	
						16L	1,73	0,24	7,08 ± 0,79 l	
				48L	2,37	0,34	6,81 ± 0,41 l			
				15L	2,53	0,58	4,37 ± 0,28 m			

continua na próxima coluna...

CI: compostos indólicos.

^a Experimento usando os solos não rizosféricos sob três diferentes tipos de manejo: Mata Secundária (MS), Hortícola Convencional (HC) e Orgânico (ORG).

^b Experimento utilizando a rizosfera de tomate plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).

^c Experimento utilizando a rizosfera de lulo plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).

^d A análise estatística para cada grupo de experimentos (Solos, Tomate/Solos e Lulo/Solos) foi realizada separadamente. As médias \pm desvio padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para ($P < 0,05$).

Tabela S2 Concentração de P solúvel em cultivos de diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por sete dias em meio líquido contendo 0,1% de P na forma insolúvel de FePO₄

Experimento ^d	Isolado	pH	P (mg L ⁻¹)	Experimento ^d	Isolado	pH	P (mg L ⁻¹)
SOLOS^a	15S	3,96	56,00 ± 0,66 a	TOMATE^b / SOLOS	19T	4,35	4,93 ± 0,49 g
	22S	4,27	30,03 ± 0,68 b		2T	4,47	4,86 ± 0,63 g
	27S	4,44	21,58 ± 0,22 c		25T	4,35	4,66 ± 0,57 g
	19S	4,23	18,61 ± 0,77 d		15T	4,05	4,13 ± 0,47 h
	BR11001	4,23	18,45 ± 0,45 d		4T	4,79	4,01 ± 0,15 h
	BR11281	4,38	12,76 ± 0,15 e		41T	4,71	3,78 ± 0,84 h
	28S	4,38	12,01 ± 0,33 e		38T	3,75	3,64 ± 0,39 h
	16S	3,02	7,55 ± 0,86 f		27T	3,82	3,57 ± 0,19 h
	24S	3,13	7,15 ± 0,53 f		35T	4,39	3,31 ± 0,19 h
	9S	4,84	4,51 ± 0,38 g		44T	3,26	3,16 ± 0,38 h
	29S	3,39	4,29 ± 0,66 g		32T	4,04	3,12 ± 0,49 h
	25S	3,35	4,17 ± 0,61 g		16T	4,36	2,57 ± 0,44 i
	26S	3,34	3,56 ± 0,49 h		23T	4,26	2,40 ± 0,50 i
	7S	4,43	3,03 ± 0,04 h		29T	4,09	2,06 ± 0,62 i
	3S	4,58	2,31 ± 0,41 i		33T	3,91	1,94 ± 0,60 i
	6S	3,38	2,11 ± 0,19 i		1T	4,51	1,61 ± 0,23 j
	23S	5,45	1,69 ± 0,27 i		3T	4,34	1,49 ± 0,36 j
	21S	5,50	1,55 ± 0,50 i		6T	4,47	0,80 ± 0,07 j
	8S	3,80	1,23 ± 0,17 i		26T	4,15	0,79 ± 0,03 j
	2S	5,02	1,20 ± 0,20 i				
TOMATE^b / SOLOS	BR11001	4,23	18,45 ± 0,45 a	LULO^c / SOLOS	BR11001	4,23	18,45 ± 0,45 a
	BR11281	4,38	12,76 ± 0,15 b		BR11281	4,38	12,76 ± 0,15 b
	39T	4,46	10,76 ± 0,53 c		23L	3,18	11,39 ± 0,29 c
	34T	4,56	9,61 ± 0,73 d		19L	3,30	7,79 ± 0,25 d
	17T	4,42	9,23 ± 0,43 d		1L	3,34	7,22 ± 0,40 e
	7T	4,13	8,92 ± 0,60 e		15L	3,25	6,73 ± 0,04 f
	36T	4,45	8,57 ± 0,50 e		4L	4,68	6,70 ± 0,24 f
	42T	4,42	8,06 ± 0,59 e		47L	4,36	5,53 ± 0,13 g
	45T	4,14	7,95 ± 0,63 e		42L	4,46	4,63 ± 0,15 h
	24T	4,15	7,34 ± 0,18 f		49L	4,27	4,24 ± 0,19 h
	50T	4,62	7,27 ± 0,35 f		6L	4,32	4,15 ± 0,22 h
	53T	4,29	6,86 ± 0,31 f		52L	4,79	3,52 ± 0,11 i
	43T	4,70	6,79 ± 0,84 f		46L	4,50	3,33 ± 0,04 i
	5T	4,24	6,76 ± 0,25 f		12L	4,09	3,26 ± 0,17 i
	51T	4,71	6,71 ± 0,11 f		48L	4,34	3,19 ± 0,09 i
	47T	4,50	6,53 ± 0,51 f		39L	4,13	2,70 ± 0,03 j
	20T	3,29	6,47 ± 0,22 f		40L	4,44	2,61 ± 0,14 j
	48T	4,82	6,46 ± 0,54 f		31L	4,51	2,59 ± 0,21 j
	28T	3,21	6,45 ± 0,25 f		26L	4,74	2,50 ± 0,19 j
	31T	4,21	6,37 ± 0,37 f		5L	3,83	2,21 ± 0,17 k
46T	4,60	6,08 ± 0,37 f	37L	4,15	2,13 ± 0,03 k		
22T	4,17	5,80 ± 0,52 f	24L	3,93	2,07 ± 0,04 k		
18T	4,22	5,78 ± 0,34 f	43L	4,66	1,45 ± 0,06 l		
21T	4,20	5,18 ± 0,72 g	27L	4,65	1,25 ± 0,15 l		
49T	4,44	4,99 ± 0,44 g	29L	4,10	0,65 ± 0,16 m		
			28L	4,18	0,59 ± 0,21 m		

P: fósforo solubilizado.

^a Experimento usando os solos não rizosféricos sob três diferentes tipos de manejo: Mata Secundária (MS), Hortícola Convencional (HC) e Orgânico (ORG).

- ^b Experimento utilizando a rizosfera de tomate plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).
- ^c Experimento utilizando a rizosfera de lulo plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).
- ^d A análise estatística para cada grupo de experimentos (Solos, Tomate/Solos e Lulo/Solos) foi realizada separadamente. As médias \pm desvio padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para ($P < 0,05$).

Tabela S3 Concentração de P solúvel em cultivos de diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por sete dias em meio líquido contendo 0,1% de P na forma insolúvel de AlPO_4

Experimento ^d	Isolado	pH	P (mg L ⁻¹)	Experimento ^d	Isolado	pH	P (mg L ⁻¹)	
SOLOS^a	15S	3,18	15,32 ± 0,19 a	TOMATE^b / SOLOS	19T	4,80	2,50 ± 0,37 d	
	26S	3,23	12,94 ± 0,36 b		51T	5,01	2,38 ± 0,34 d	
	BR11001	3,21	9,44 ± 0,37 c		35T	5,21	1,90 ± 0,11 e	
	16S	3,31	8,74 ± 0,60 c		29T	5,29	1,76 ± 0,16 e	
	9S	3,66	7,49 ± 0,45 d		23T	4,77	1,57 ± 0,28 e	
	24S	3,82	6,61 ± 0,41 e		17T	5,33	1,47 ± 0,34 e	
	7S	3,78	6,00 ± 0,17 f		47T	5,31	1,46 ± 0,36 e	
	6S	3,49	5,17 ± 0,19 g		24T	4,66	1,44 ± 0,17 e	
	19S	3,83	4,27 ± 0,09 h		41T	3,66	1,41 ± 0,24 e	
	BR11281	3,77	3,63 ± 0,44 h		39T	5,12	1,04 ± 0,04 f	
	23S	3,89	2,94 ± 0,61 i		50T	5,48	0,69 ± 0,18 f	
	12S	4,61	2,80 ± 0,33 i		26T	5,42	0,62 ± 0,09 f	
	29S	3,56	2,79 ± 0,33 i		LULO^c / SOLOS	23L	3,50	17,05 ± 0,13 a
	11S	5,48	2,53 ± 0,35 i			19L	3,45	13,29 ± 0,11 b
	22S	3,92	1,82 ± 0,45 j			15L	3,45	11,57 ± 0,06 c
	17S	4,20	1,55 ± 0,41 j			1L	3,33	10,52 ± 0,09 d
	28S	3,87	1,14 ± 0,10 k			BR11001	3,21	9,44 ± 0,37 e
25S	4,43	0,74 ± 0,07 k	BR11281	3,77		3,63 ± 0,44 f		
3S	4,02	0,70 ± 0,17 k	52L	4,45		2,69 ± 0,15 g		
14S	4,43	0,64 ± 0,12 k	32L	3,29		2,08 ± 0,06 h		
TOMATE^b / SOLOS	44T	3,32	14,57 ± 0,37 a	47L		4,03	1,62 ± 0,06 i	
	BR11001	3,21	9,44 ± 0,37 b	49L		4,08	1,51 ± 0,17 i	
	BR11281	3,77	3,63 ± 0,44 c	39L		4,14	1,32 ± 0,28 j	
	45T	4,10	3,56 ± 0,30 c	37L	3,78	1,23 ± 0,12 j		
	21T	4,88	2,87 ± 0,04 d	50L	4,22	1,11 ± 0,09 j		
	53T	5,60	2,51 ± 0,25 d	18L	3,46	0,70 ± 0,03 k		
	42T	5,17	2,51 ± 0,34 d	14L	3,36	0,65 ± 0,04 k		
	continua na próxima coluna...			29L	3,35	0,65 ± 0,10 k		

P: fósforo solubilizado.

^a Experimento usando os solos não rizosféricos sob três diferentes tipos de manejo: Mata Secundária (MS), Hortícola Convencional (HC) e Orgânico (ORG).

^b Experimento utilizando a rizosfera de tomate plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).

^c Experimento utilizando a rizosfera de lulo plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).

^d A análise estatística para cada grupo de experimentos (Solos, Tomate/Solos e Lulo/Solos) foi realizada separadamente. As médias ± desvio padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para ($P < 0,05$).

Tabela S4 Capacidade quelante de ferro apresentada por diferentes bactérias diazotróficas isoladas a partir de solos com diferentes manejos (MS, HC e ORG) e da rizosfera de tomate e lulo plantados nesses tipos de solos, após crescimento por cinco dias em meio sólido contendo 1 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e interpretada como capacidade de produção de sideróforos

Experimento ^d	Isolado	IPS	Experimento ^d	Isolado	IPS	
SOLOS ^a	29S	2,5 ± 0,03 a	TOMATE ^b / SOLOS	17T	1,4 ± 0,01d	
	24S	2,4 ± 0,19 b		14T	1,4 ± 0,10 d	
	16S	2,4 ± 0,09 b		33T	1,3 ± 0,08 d	
	20S	2,3 ± 0,11 b		2T	1,3 ± 0,05 d	
	18S	2,2 ± 0,12 c		20T	1,3 ± 0,10 d	
	11S	2,1 ± 0,10 c		1T	1,2 ± 0,11 e	
	25S	2,1 ± 0,04 c		36T	1,2 ± 0,02 e	
	12S	1,5 ± 0,06 d		27T	1,1 ± 0,05 e	
	2S	1,5 ± 0,03 d				
	17S	1,4 ± 0,02 d				
	23S	1,4 ± 0,06 d				
	14S	1,4 ± 0,03 d				
	TOMATE ^b / SOLOS	8T		2,0 ± 0,04 a	LULO ^c / SOLOS	1L
25T		1,8 ± 0,07 b	37L	2,4 ± 0,08 b		
9T		1,7 ± 0,11 b	20L	2,2 ± 0,04 c		
48T		1,6 ± 0,05 c	48L	2,2 ± 0,07 c		
32T		1,6 ± 0,09 c	23L	2,1 ± 0,14 d		
29T		1,6 ± 0,07 c	19L	2,0 ± 0,10 d		
49T		1,6 ± 0,11 c	5L	2,0 ± 0,13 d		
10T		1,6 ± 0,10 c	15L	1,9 ± 0,05 d		
4T		1,5 ± 0,05 c	50L	1,9 ± 0,05 d		
41T		1,5 ± 0,08 c	28L	1,8 ± 0,04 e		
30T		1,5 ± 0,06 c	39L	1,8 ± 0,04 e		
21T		1,4 ± 0,06 d	27L	1,7 ± 0,07 e		
Continua na próxima coluna...		22L	1,6 ± 0,07 f			
			14L	1,5 ± 0,09 f		
		43L	1,4 ± 0,07 g			
		49L	1,3 ± 0,01 g			
		17L	1,2 ± 0,03 g			

IPS: Índice de produção de sideróforos.

^a Experimento usando os solos não rizosféricos sob três diferentes tipos de manejo: Mata Secundária (MS), Hortícola Convencional (HC) e Orgânico (ORG).

^b Experimento utilizando a rizosfera de tomate plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).

^c Experimento utilizando a rizosfera de lulo plantado em cada um dos tipos de solos (MS, HC ou ORG).

^d A análise estatística para cada grupo de experimentos (Solos, Tomate/Solos e Lulo/Solos) foi realizada separadamente. As médias ± desvio padrão seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para ($P < 0,05$).

Tabela S5 Potencial biotecnológico dos isolados segundo a somatória das notas atribuídas para cada atividade apresentada.

Isolado	Origem	Meio	Gênero	Produção de CI	Solubilização de FePO ₄	Solubilização de AlPO ₄	Produção de Sideróforos	Total	Potencial Biotecnológico
15S	solo hort	JNFb	<i>Enterobacter</i>	3	3	3	0	9	ALTO
16S	solo org	JMV	<i>Pseudomonas</i>	0	2	3	3	8	
19S	solo org	JMV	<i>Enterobacter</i>	3	3	2	0	8	
24S	solo org	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	2	3	3	8	
1L	lulo/mata	LGI-P	<i>Burkholderia</i>	0	2	3	3	8	
15L	lulo/org	LGI	<i>Burkholderia</i>	1	2	3	2	8	
23L	lulo/mata	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	3	3	2	8	
37L	lulo/mata	JNFb	<i>Rhizobium</i>	3	1	1	3	8	
22S	solo org	JNFb	<i>Enterobacter</i>	3	3	1	0	7	
28S	solo org	JMV	<i>Enterobacter</i>	3	3	1	0	7	
29S	solo org	JMV	<i>Pseudomonas</i>	0	2	2	3	7	
4T	tomate/hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	3	2	0	2	7	
17T	tomate/hort	JMV	<i>Pseudomonas</i>	1	3	1	2	7	
21T	tomate/org	JMV	<i>Rhizobium</i>	1	2	2	2	7	
41T	tomate/hort	NFb	<i>Rhizobium</i>	3	1	1	2	7	
19L	lulo/org	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	2	3	2	7	
9S	solo mata	JNFb	<i>Pseudomonas</i>	1	2	3	0	6	MÉDIO
12S	solo hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	0	2	2	6	
27S	solo org	JMV	<i>Enterobacter</i>	3	3	0	0	6	
44T	tomate/mata	LGI	<i>Massilia</i>	2	1	3	0	6	
48T	tomate/hort	LGI	<i>Rhizobium</i>	2	2	0	2	6	
39L	lulo/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	1	1	2	6	
50L	lulo/mata	JNFb	<i>Rhizobium</i>	3	0	1	2	6	
23S	solo org	JMV	<i>Pseudomonas</i>	0	1	2	2	5	
25S	solo org	JMV	<i>Pseudomonas</i>	0	2	1	2	5	
11S	solo hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	0	1	2	5	
2T	tomate/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	2	0	2	5	
7T	tomate/hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	3	0	0	5	
20T	tomate/hort	JMV	<i>Pseudomonas</i>	1	2	0	2	5	
25T	tomate/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	2	0	2	5	
29T	tomate/hort	JMV	<i>Rhizobium</i>	1	1	1	2	5	
35T	tomate/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	3	1	1	0	5	

Continua...

Tabela S5 Continuação...

Isolado	Origem	Meio	Gênero	Produção de CI	Solubilização de FePO ₄	Solubilização de AlPO ₄	Produção de Sideróforos	Total	Potencial Biotecnológico	
36T	tomate/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	3	0	2	5	MEDIO	
49T	tomate/hort	LGI	<i>Pseudomonas</i>	1	2	0	2	5		
14L	lulo/org	LGI	<i>Rhizobium</i>	2	0	1	2	5		
27L	lulo/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	2	1	0	2	5		
43L	lulo/hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	1	0	2	5		
49L	lulo/hort	JNFb	<i>Roseateles</i>	0	2	1	2	5		
52L	lulo/mata	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	1	2	0	5		
7S	solo mata	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	1	3	0	4		
26S	solo org	JMV	<i>Cupriavidus</i>	0	1	3	0	4		
2S	solo mata	JMV	<i>Massilia</i>	1	1	0	2	4		
14S	solo hort	JNFb	<i>Pseudomonas</i>	1	0	1	2	4		
18S	solo org	JMV	<i>Rhizobium</i>	2	0	0	2	4		
1T	tomate/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	1	0	2	4		
8T	tomate/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	0	0	2	4		
14T	tomate/hort	NFb	<i>Rhizobium</i>	2	0	0	2	4		
27T	tomate/org	JMV	<i>Rhizobium</i>	1	1	0	2	4		
34T	tomate/mata	NFb	<i>Rhizobium</i>	1	3	0	0	4		
39T	tomate/hort	LGI	<i>Rhizobium</i>	0	3	1	0	4		
42T	tomate/org	JMV	<i>Rhizobium</i>	1	2	1	0	4		
45T	tomate/org	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	2	2	0	4		
50T	tomate/hort	JMV	<i>Rhizobium</i>	1	2	1	0	4		
5L	lulo/org	NFb	<i>Pseudomonas</i>	1	1	0	2	4		
22L	lulo/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	2	0	0	2	4		
47L	lulo/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	2	1	0	4		
48L	lulo/mata	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	1	0	2	4		
6S	solo mata	JMV	<i>Enterobacter</i>	0	1	2	0	3		BAIXO
17S	solo org	JMV	<i>Pseudomonas</i>	0	0	1	2	3		
20S	solo org	LGI	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	3	3		
9T	tomate/hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	0	0	2	3		
10T	tomate/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	0	0	2	3		
19T	tomate/hort	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	2	1	0	3		
24T	tomate/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	2	1	0	3		

Continua...

Tabela S5 continuação...

Isolado	Origem	Meio	Gênero	Produção de CI	Solubilização de FePO ₄	Solubilização de AlPO ₄	Produção de Sideróforos	Total	Potencial Biotecnológico
26T	tomate/hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	1	1	1	0	3	BAIXO
32T	tomate/mata	NFb	<i>Rhizobium</i>	0	1	0	2	3	
33T	tomate/hort	LGI	<i>Rhizobium</i>	0	1	0	2	3	
43T	tomate/mata	LGI	<i>Rhizobium</i>	1	2	0	0	3	
47T	tomate/hort	JMV	<i>Caulobacter</i>	0	2	1	0	3	
51T	tomate/hort	JMV	<i>Variovorax</i>	0	2	1	0	3	
53T	tomate/hort	JMV	<i>Variovorax</i>	0	2	1	0	3	
17L	lulo/mata	LGI	<i>Rhizobium</i>	1	0	0	2	3	
28L	lulo/mata	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	1	0	2	3	
29L	lulo/hort	JMV	<i>Rhizobium</i>	1	1	1	0	3	
3S	solo mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	1	1	0	2	
13S	solo hort	JNFb	<i>Rhizobium</i>	2	0	0	0	2	
5T	tomate/mata	JNFb	<i>Variovorax</i>	0	2	0	0	2	
13T	tomate/mata	LGI	NI	2	0	0	0	2	
15T	tomate/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	2	0	0	2	
18T	tomate/hort	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	2	0	0	2	
22T	tomate/org	JMV	NI	0	2	0	0	2	
23T	tomate/mata	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	1	1	0	2	
28T	tomate/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	2	0	0	2	
30T	tomate/mata	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	0	0	2	2	
31T	tomate/mata	LGI-P	<i>Rhizobium</i>	0	2	0	0	2	
46T	tomate/hort	JMV	<i>Variovorax</i>	0	2	0	0	2	
4L	lulo/mata	LGI-P	NI	0	2	0	0	2	
6L	lulo/hort	NFb	<i>Bacillus</i>	0	2	0	0	2	
20L	lulo/org	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	0	0	2	2	
42L	lulo/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	0	2	0	0	2	
8S	solo mata	JMV	<i>Cupriavidus</i>	0	1	0	0	1	
21S	solo org	JNFb	<i>Stenotrophomonas</i>	0	1	0	0	1	
3T	tomate/mata	JNFb	<i>Herbaspirillum</i>	0	1	0	0	1	
6T	tomate/mata	JNFb	<i>Rhizobium</i>	0	1	0	0	1	
16T	tomate/org	JMV	<i>Roseateles</i>	0	1	0	0	1	
38T	tomate/org	LGI	<i>Variovorax</i>	0	1	0	0	1	
11L	lulo/org	LGI	<i>Pseudomonas</i>	1	0	0	0	1	

Continua...

Tabela S5 Continuação...

Isolado	Origem	Meio	Gênero	Produção de CI	Solubilização de FePO ₄	Solubilização de AlPO ₄	Produção de Sideróforos	Total	Potencial Biotecnológico ^a
12L	lulo/org	LGI	<i>Rhizobium</i>	0	1	0	0	1	BAIXO
16L	lulo/org	LGI	<i>Rhizobium</i>	1	0	0	0	1	
18L	lulo/mata	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	0	1	0	1	
24L	lulo/mata	JMV	<i>Burkholderia</i>	0	1	0	0	1	
25L	lulo/org	JMV	<i>Massilia</i>	1	0	0	0	1	
26L	lulo/org	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	1	0	0	1	
31L	lulo/org	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	1	0	0	1	
32L	lulo/hort	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	0	1	0	1	
40L	lulo/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	0	1	0	0	1	
46L	lulo/mata	JNFb	<i>Pseudomonas</i>	0	1	0	0	1	
1S	solo mata	JNFb	<i>Stenotrophomonas</i>	0	0	0	0	0	SEM POTENCIAL
4S	solo mata	JMV	<i>Xanthomonas</i>	0	0	0	0	0	
5S	solo mata	JMV	<i>Novosphingobium</i>	0	0	0	0	0	
10S	solo mata	JNFb	<i>Cupriavidus</i>	0	0	0	0	0	
12T	tomate/mata	LGI	<i>Rhizobium</i>	0	0	0	0	0	
8L	lulo/mata	NFb	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	0	0	
9L	lulo/org	JMV	<i>Rhizobium</i>	0	0	0	0	0	
13L	lulo/hort	LGI	<i>Rhizobium</i>	0	0	0	0	0	
30L	lulo/org	JMV	<i>Variovorax</i>	0	0	0	0	0	
38L	lulo/org	JNFb	<i>Rhizobium</i>	0	0	0	0	0	

CI: compostos indólicos.

^a Potencial biotecnológico dos isolados segundo o somatório das notas atribuídas para cada uma das atividades de promoção de crescimento avaliadas, sendo catalogados como segue: sem potencial (nota total igual a 0); baixo potencial (nota total entre 1 e 3); médio potencial (nota total entre 4 e 6) e alto potencial (nota total entre 7 e 9).

6 CONCLUSÕES

- A composição e densidade das populações microbianas associadas à rizosfera do tomate e lulo foram influenciadas pela espécie vegetal e o manejo do solo.
- O efeito rizosfera diminui a diversidade de bactérias diazotróficas associadas ao tomate e lulo, mas aumentou a densidade populacional de determinados gêneros bacterianos, principalmente *Rhizobium*.
- Houve uma maior seleção de bactérias pela rizosfera de tomate que pela rizosfera de lulo sendo *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* os gêneros mais abundantes
- Várias bactérias conseguiram produzir compostos indólicos, sideróforos e solubilizar fosfatos, sugerindo que esses microrganismos têm potencial para promover o crescimento de plantas de tomate e lulo e algumas dessas estirpes poderiam ser testadas em futuros experimentos de inoculação de plantas em campo.
- Dentre a coleção de isolados obtida, 49% apresentaram potencial aplicação na promoção do crescimento de tomate, onde 32% correspondem a isolados provenientes do solo, 40% da rizosfera de tomate e 28% da rizosfera de lulo.
- Este estudo foi o primeiro a reportar a composição da comunidade diazotrófica bacteriana associada com a rizosfera de lulo.

ANEXOS

ANEXO 1 – Solução Salina para Diluição Seriada (BALDANI, 1980)

K ₂ HPO ₄	sol. 10%	1 MI
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	0,5 mL
NaCl	sol. 10%	0,2 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	0,5 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	1 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		0,5 mL
-Completar para 1 L com água destilada		
-Autoclavar por 20 min a 121 °C		

ANEXO 2 – Meios de Cultivo Semi-Seletivos

• Meio JMV (BALDANI, 1996)

Manitol		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
-Ajustar o pH para 5,0-5,4		
-Completar para 1 L com água destilada		
-Adicionar 1,4 g L ⁻¹ de ágar para meios semi-sólidos e 25 g L ⁻¹ para sólido		
-Autoclavar por 20 min a 121 °C		
Obs. Nos meios sólidos foi adicionado 100 mg de extrato de levedura		

• Meio LGI (MAGALHÃES et al., 1983)

Sacarose		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	2 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	6 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0,1%	6 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 10%	2 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1%	
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	5 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
-Ajustar o pH para 6,0-6,2		
-Completar para 1 L com água destilada		
-Adicionar 1,2 g L ⁻¹ de ágar para meios semi-sólidos e 15 g L ⁻¹ para sólido		
-Autoclavar por 20 min a 121 °C		

• **Meio LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995)**

Sacarose		20 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	0,5 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	1,5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0,1%	6 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	5 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL

-Ajustar o pH para 5,5

-Completar para 1 L com agua destilada

-Adicionar 1,2 g L⁻¹ de ágar para meios semi-sólidos e 25 g L⁻¹ para sólido

-Autoclavar por 20 min a 121 °C

• **Meio NFb (BALDANI, 1996)**

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
KOH		4,5 g

-Ajustar o pH para 6,5

-Completar para 1 L com agua destilada

-Adicionar 1,3 g L⁻¹ de ágar para meios semi-sólidos e 15 g L⁻¹ para sólido

-Autoclavar por 20 min a 121 °C

Obs. Nos meios sólidos foi adicionado 50 mg de extrato de levedura

• **Meio JNFb (BALDANI; DÖBEREINER, 1980)**

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
KOH		4,5 g

-Ajustar o pH para 5,8

-Completar para 1 L com agua destilada

-Adicionar 1,5 g L⁻¹ de ágar para meios semi-sólidos e 17 g L⁻¹ para sólido

-Autoclavar por 20 min a 121 °C

Obs. Nos meios sólidos foi adicionado 20 mg de extrato de levedura

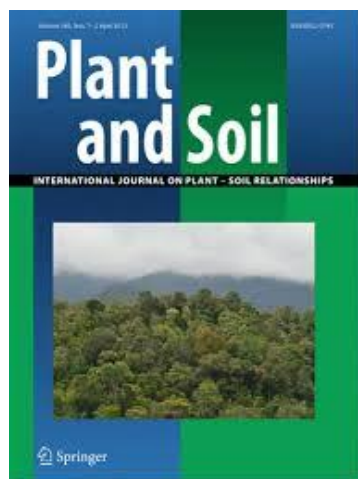
• **Solução de Micronutrientes para Meio de Cultivo (DÖBEREINER et al, 1995)**

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,175 g
H_3BO_3	1,4 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,12 g
-Completar para 1 L com agua destilada	

ANEXO 3 – Meio Dygs (RODRIGUES NETO et al, 1986)

Glicose	2 g
K_2HPO_4	0,5 g
Peptona	1,5 g
Extrato de levedura	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
-Ajustar o pH para 6,5	
-Completar para 1 L com agua destilada	
-Autoclavar por 20 min a 121 °C	

ANEXO 4 – Normas para a Submissão do Artigo para o Periódico Plant and Soil



ISSN: 0032-079X (Print) 1573-5036 (Online)

DESCRIPTION

Plant and Soil publishes original papers and review articles exploring the interface of plant biology and soil sciences, and that enhance our mechanistic understanding of plant-soil interactions. This includes both fundamental and applied aspects of mineral nutrition, plant-water relations, symbiotic and pathogenic plant-microbe interactions, root anatomy and morphology, soil biology, ecology, agrochemistry and agrophysics.

Articles discussing a major molecular or mathematical component also fall within the scope of the journal. All contributions appear in the English language. *Plant and Soil* is published under the auspices of the Royal Netherlands Society of Agricultural Science. The Editor-in-Chief is Hans Lambers, University of Western Australia, Crawley, Australia

AIMS AND SCOPE

Plant and Soil publishes original research papers and solicited review articles that deal with the interface of plant biology and soil sciences, and are of general interest. We give preference to those manuscripts with a strong mechanistic component which develop and test hypotheses aimed at improving understanding of underlying mechanisms of plant-soil interactions. Manuscripts can include both fundamental and applied aspects of mineral nutrition, plant water relations, symbiotic and pathogenic plant-microbe interactions, root anatomy and morphology, soil biology, ecology, agrochemistry and agrophysics. Articles including a major molecular or mathematical component also fall within the scope of the journal. All contributions appear in the English language, with consistent spelling using either American or British English. *Plant and Soil* provides rapid publication of full-length papers describing the results of original research. Articles accepted for publication in *Plant and Soil* report novel findings of general significance. Reviews, mini-reviews and commentaries are usually solicited by members of the Editorial Board. However, individuals who wish to prepare a review or a mini-review are encouraged to contact the Editor-in-Chief (hans.lambers@uwa.edu.au) prior to submitting a manuscript. Occasionally *Plant and Soil* will publish special issues containing a collection of articles on a theme considered by the editors to be of general interest to our readers. These special issues may consist of a selection of presentations from a scientific meeting or a collection of papers organised by an individual or group. In all cases, manuscripts submitted for publication as part of a special issue will be subject to the same review process required of regular submissions. Individuals or groups wishing to organise a special issue of *Plant and Soil* should contact the Publishing Assistant (Melanie.vanOverbeek@springer.com) to discuss the feasibility of the project.

ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION

Plant and Soil is now using a fully web-enabled online manuscript submission and review system, which offers authors the option to track the progress of the review process of manuscripts in real time. To keep the review time as short as possible, authors are requested to submit their manuscripts online at: <http://plso.edmgr.com>.

Authors are requested to submit their manuscript accompanied by a note to the Editor-in-Chief, explaining how the submitted manuscript falls within the scope of Plant and Soil. A sentence detailing that the manuscript has not been submitted to an alternative journal at the same time is also required. The authors are requested to nominate one or more Section Editor(s) who could handle their manuscript, and suggestions for reviewers are welcomed. The online manuscript submission and review system for Plant and Soil offers easy and straightforward login and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript.

NOTE: All manuscripts should be submitted using the journal's online manuscript submission system. By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout and disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar

- [Submit your manuscript online](#)

Page Charges

No page charges are levied.

Time of Publication

The Editor-in-Chief assigns manuscripts to a Section Editor, who makes the final editorial decision based on the advice of at least two independent reviewers. Manuscripts will be reviewed within 2 months of submission and published within 4 months of final acceptance. When papers are accepted subject to revision, usually only a single revised version will be considered, and the revised manuscript must be submitted within 8 weeks of the acceptance in principle.

Cover Photograph

Upon acceptance of the manuscript, we strongly advise the author to supply the journal with a high-resolution colour photograph which will accompany the article title in the online journal contents. The best photograph amongst the papers of an issue will be selected for the cover of the hard copy. Ideally, digital photographs should have a minimum resolution of 300 dpi, an image size of 15 cm x 10 cm, and saved as either tiff or jpeg file. Alternatively, hard copy photographs of 10 cm x 10 cm are also accepted and should be sent to:

Springer

Attn. T. Muller

P.O. Box 990

3300 AZ Dordrecht

The Netherlands

(E-mail: tanya.muller@springer.com)

(Please note that authors are not charged for the publication of this colour photograph.)

MANUSCRIPT PRESENTATION

The journals language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. The manuscripts should be provided with a preceding page, mentioning the numbers of text pages, tables and figures, a short running title and name, address (including name of country), telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author. The manuscripts should be typed in double space and all margins be kept wide. There should be line-numbering in all manuscripts. The manuscript should be divided into sections, viz. Keywords, Abstract, Abbreviations, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References. The Abstract must contain the aim of the research and a brief conclusion, as well as the main findings of the research project. Keywords (maximum 6) should be given in alphabetical order and separated by commas. The title should provide a concise statement of the contents. In dividing and subdividing the manuscript, lower case headings should be used. The sections should not be

numbered. References to notes in the text should be superior numbers. References in the text should be listed either alphabetically or chronologically, but the order must be consistent throughout the entire manuscript.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

Figures, photographs and tables should be added separately, i.e. not inserted in the typed text. Captions to figures and photographs should be collected into one or more separate pages. Captions to tables should be given at the beginning of a table. Line drawings should be in a form suitable for reproduction without modification. Extremely small type should be avoided as figures are often reduced in size. Legends and text in figures should be inserted. Table notes should be referred to by superscript letters. Photographs should be supplied as black-and-white high-contrast glossy prints. See below for colour.

Colour Figures

Springer offers two options for reproducing colour illustrations in your article. Please let us know which you prefer:

- 1) Free online colour. The colour figure will only appear in colour on the website for Plant and Soil and not in the printed version of the journal.
- 2) Online and printed colour. The colour figures will appear in colour on our website and in the printed version of Plant and Soil. The charges are EUR 950/USD 1150 per article.

ABBREVIATIONS AND UNITS

The Latin name(s) as well as authority (and, where appropriate, cultivar preceded by cv.) of investigated species must be mentioned both in the Abstract and in the Materials and Methods. Latin biological names should be italicised. Only SI units and abbreviations should be used. Abbreviations should be explained when they first appear in the text. If a non-standard abbreviation is to be used extensively, it should be defined in full on page 2 as mentioned above. For mineral contents the elements (P, N, K, etc.) should be used. Isotopes should be indicated as ^{14}C , ^{32}P , etc. Ions should be mentioned as H^+ , Mg^{2+} , etc. For molar concentration italic M should be used.

ACKNOWLEDGEMENTS

These should follow the Discussion. If references to grant support are cited, write out complete names of the funding agencies

REFERENCES

References to literature should be arranged alphabetically. References to literature in the text should be made in alphabetical or chronological order (but consistently) by mentioning author and year; in the case of two authors, both should be mentioned, but with three or more only the name of the first author plus et al. should be given. Do not use in list or text: unpublished results or in preparation. An in press reference to Plant and Soil should state the file number. Reference to personal communications should only be mentioned in the text. Please follow the style shown below:

Periodicals

Terman G L, Moreno E C and Osborn G 1984 Acidulation of phosphate rock in soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 28, 104-107

Books (identical author and editor)

Giller K E and Wilson K J 1991 Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems. CAB International, Wallingford, Oxon. 313 pp. 484

Article in book

Fageria N K 1990 Iron requirement of cereals and legumes in solution culture. In *Plant Nutrition-Physiology and Applications*. Ed. M L van Beusichem. pp. 213-217. Springer, Dordrecht.

Please note: No periods after initials.

Journal names should be abbreviated in conformity with the Bibliographic Guide for Editors and Authors (BIOSIS, Chemical Abstracts Service and Engineerings Index, Inc., latest edition). A good online guide to Journal Title Abbreviations is: http://mithrandir.caltech.edu/isi/isicgi/help/A_abrvjt.html.

- [Online guide to Journal Title Abbreviations](http://mithrandir.caltech.edu/isi/isicgi/help/A_abrvjt.html)

PAGE PROOFS, OFFPRINTS

Upon acceptance of the manuscript, the author will be informed about the approximate time of publication and

be requested to sign the Consent to Publish & Transfer of Copyright form. Page proofs will be sent about two months prior to publication, together with an offprints order. Proofs and forms should be handled promptly and returned to the Editorial Office. No changes other than corrections should be made. If the author insists on changes from the original text, the author may be charged by the publisher, as such changes are rather expensive.

Any correspondence about offprints should be directed to the publisher:

Springer

P.O. Box 990

3300 AZ Dordrecht

The Netherlands

Phone: +31 (0) 78 657 6555

E-mail: editdept@springer.com

Fifty offprints will be supplied free of charge. Additional offprints can be purchased at prices as stated on the offprints order form

SPRINGER OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit www.springeronline.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.