

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Crescimento radicular em plântulas de
tomate em resposta a inoculação da estirpe
ENA 4593 de *Serratia* sp.**

Ana Carla Pinheiro Lima

2015



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

**Crescimento radicular em plântulas de tomate em resposta
a inoculação da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp.**

ANA CARLA PINHEIRO LIMA

Sob a Orientação do Professor

Dr. Leonardo Oliveira Médici

e Co-orientação da Professora

Dra. Débora Alves Gonzaga da Silva Ballesteiro Pereira

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Fitotecnia**, no
Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área
de Concentração em Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ

Agosto de 2015

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732c Lima, Ana Carla Pinheiro , 1977-
Crescimento radicular em plântulas de tomate em
resposta a inoculação da estirpe ENA 4593 de *Serratia*
sp. / Ana Carla Pinheiro Lima. - 2015.
75 f.

Orientador: Leonardo Oliveira Médici.
Coorientadora: Débora Alves Gonzaga da Silva
Ballesteiro Pereira.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Fitotecnia, 2015.

1. Estresse hídrico . 2. *Serratia sp.* 3. Tomate.
I. Médici, Leonardo Oliveira, 1967-, orient. II.
Pereira, Débora Alves Gonzaga da Silva Ballesteiro ,
1976-, coorient. III Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Fitotecnia. IV. Título.

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

ANA CARLA PINHEIRO LIMA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

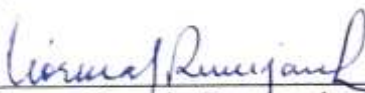
TESE APROVADA EM 28/08/2015



Dr. Leonardo Oliveira Médici - UFRRJ
(Orientador)



Dra. Anelise Dias - UFRRJ



Dra. Norma Gouvêa Rumjanek - Agrobiologia-EMBRAPA



Dra. Débora Alves Gonzaga da Silva Ballesteiro Pereira-UFRRJ



Dra. Luzia Teixeira de Azevedo Soares Sêmedo - UNIFESO

*Dedico este trabalho
ao meu filho **Eduardo de Assis Lima Filho***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, e as possibilidades de recomeçar todas as vezes que necessário.

Aos meus pais Hilton Pinheiro e Maria Gilda da Silva Pinheiro pelo amor, compreensão, apoio em todos os momentos que eu precisei. Mãe, sou muito grata a você, por se prontificar em ficar todas as vezes que necessário com o meu filho.

A minha família, meu marido Eduardo de Assis Lima e ao meu filho Eduardo de Assis Lima Filho, pela paciência, incentivo, companheirismo e apoio nos momentos mais críticos. Agradeço a compreensão nos momentos de ausência e peço desculpas pelos muitos momentos de stress. Amo vocês.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela oportunidade concedida e por ampliar a minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Leonardo Oliveira Médici, meu orientador, pelos inúmeros ensinamentos, dedicação, compreensão, paciência e credibilidade imputadas à mim, em diversos momentos da minha caminhada. Tudo que eu escrever aqui, é pouco diante da gratidão que sinto por você. Muito Obrigada!

A minha Co-orientadora, Dra. Débora Alves Gonzaga da Silva Ballesteiro Pereira, pela parceria, atenção, carinho, empenho em me passar seus ensinamentos, com certeza sem sua ajuda esse trabalho não teria adquirido êxito.

Aos membros da pela prontidão e disposição em contribuir com o meu trabalho.

A Universidade Severino Sombra (USS), pelo auxílio e fornecimento das instalações dos Laboratórios de Microbiologia e Botânica.

A Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas da USS, Maria das Graças Ávila Guimarães, pelo apoio, incentivo, torcida e por muitas vezes me estimular a continuar a caminhada.

Aos funcionários da USS, principalmente os do apoio técnico, Neila, Érica, Alberto, José Carlos e Cláudia, pela ajuda e trabalho nos bastidores da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Ana Carla Pinheiro Lima, filha de Hilton Pinheiro e Maria Gilda da Silva Pinheiro, nasceu em Valença, estado do Rio de Janeiro, em 18 de outubro de 1977. cursou o primeiro Grau na Escola Estadual Associação Balbina Fonseca, e concluiu o Curso de Formação de Professores em 1995 na Escola Estadual Instituto de Educação Deputado Luiz Pinto em Valença-RJ. Ingressou na Universidade Severino Sombra-Vassouras/RJ, em 1996 no Curso de Ciências Biológicas, onde concluiu o curso em 1999. No ano de 2000 matriculou-se no Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária (*Latu-sensu*), obtendo o título de especialista com o projeto de conclusão de Curso voltado para área de concentração em Diagnóstico Microbiológico. Também no ano de 2000 já lecionava em escolas da Rede Privada como Professora de Biologia do Ensino Médio. Em abril de 2003, ingressou no Programa de Pós-graduação da Universidade Santa Úrsula na categoria de Mestrado (*Strictu-sensu*), na área de concentração em Microbiologia Marinha, obtendo o título de Mestre em Ciências do Mar em 2005. Durante o período que estive matriculada no Programa de Pós-graduação (Mestrado), foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Professora da Rede Estadual de Ensino do Estado do Rio de Janeiro, foi investida no cargo de Professora Docente I no ano de 2009. Ainda em 2009 foi convidada a ocupar o cargo de Professora Auxiliar das disciplinas de Microbiologia, Imunologia e Biologia Celular e Molecular na Instituição de Ensino Superior (IES) - Fundação Educacional Dom André Arcoverde (Valença/RJ) e também no mesmo ano começou a trabalhar como Professora Assistente II das disciplinas de Microbiologia Geral e Ambiental, Sistemática de Plantas Avasculares e Fungos e Toxicologia na Instituição de Ensino Superior (IES) Universidade Severino Sombra (Vassouras/RJ). Em agosto de 2011 iniciou seus estudos no Curso de Pós-graduação em Fitotecnia à nível de doutorado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com a linha de pesquisa voltada para área de Microbiologia e Fisiologia Vegetal. Ao final do ano de 2013, desligou-se de suas funções na IES FAA. Atualmente trabalha na Universidade Severino Sombra-Vassouras/RJ.

RESUMO

LIMA, Ana Carla Pinheiro. **Crescimento radicular em plântulas de tomate em resposta a inoculação da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp.** 75p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

As rizobactérias promotoras de crescimento são bactérias do solo que habitam o entorno da raiz, e estão direta ou indiretamente envolvidas na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas. A eficiência da produtividade desses grupos de microrganismos pode ser aplicada ao plantio de culturas, constituindo uma alternativa interessante, para minimizar os efeitos negativos do estresse hídrico. Para tanto, a presente tese teve por objetivos; verificar se o mecanismo de promoção de crescimento da bactéria é similar ao promovido por PEG₆₀₀₀, ácido indol-acético (AIA) e argila e comparar os possíveis efeitos do estresse hídrico sobre o tomateiro com os efeitos da inoculação da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp.. A metodologia baseou-se em bioensaios laboratoriais, utilizando semente de tomate cv. Santa Clara (*Solanum lycopersicum* L.), previamente desinfestadas e mantidas em câmara de crescimento com temperatura e fotoperíodo de 25°C e 12 horas, respectivamente. As sementes germinadas foram submetidas a diferentes tratamentos: testemunha; PEG 7%; *Serratia* sp., AIA e Argila. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, e os dados obtidos, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o auxílio do programa estatístico Microsoft Excel e Sars, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados encontrados revelaram que a promoção de crescimento na raiz do tomateiro por *Serratia* sp. é similar ao promovido por PEG 7%, diferindo significativamente dos resultados encontrados com diferentes doses de AIA e argila. A promoção de crescimento radicular em tomate por *Serratia* sp. e PEG 7% indicam em parte, um efeito físico, uma vez que a restrição hídrica imposta pela molécula de PEG diminui a capacidade de movimentação da água, por aumentar as concentrações de solutos no meio exógeno (estresse coloidal), fato este também observado por bactérias, ao colonizarem os tecidos e células vegetais – formação biofilme, e consequentemente redução da condutividade hidráulica da água através da raiz. Conclusões, a estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. faz a raiz do tomateiro crescer, afetando a morfologia da raiz e isso pode ser parcialmente explicado por um efeito físico do PEG e o estímulo a promoção de crescimento radicular em tomate produzido pela bactéria não pode ser reproduzido pela auxina, sugerindo que o mecanismo de promoção de crescimento não esteja associado a esse fitormônio.

Palavras-chave: Estresse hídrico, *Serratia* sp., tomate.

ABSTRACT

LIMA, Ana Carla Pinheiro. **Root growth on tomato seedlings in response to inoculation of strain ENA 4593 from *Serratia* sp.** 75p. Thesis (Doctorate in Phytotechnics). Instituto de Agronomia. Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Growth-promoting rhizobacteria are soil bacteria that inhabit the surrounding root, and are directly or indirectly involved in promoting plant growth and development. The productivity efficiency of these groups of microorganisms can be applied to crop planting, constituting an interesting alternative to minimize the negative effects of water stress. Therefore, the present thesis had as objectives; to verify if the mechanism of growth promotion of the bacterium is similar to that promoted by PEG₆₀₀₀, indole acetic acid (IAA) and clay and to compare the possible effects of water stress on tomato with the effects of inoculation ENA 4593 strain of *Serratia* sp. The methodology was based on laboratory bioassays using tomato seed cv. Santa Clara (*Solanum lycopersicum* L.), previously disinfected and kept in a growth chamber with temperature and photoperiod of 25 ° C and 12 hours, respectively. The germinated seeds were submitted to different treatments: control; PEG 7%; *Serratia* sp., IAA and Clay. The treatments were arranged in a completely randomized design, and the obtained data were submitted to analysis of variance (ANOVA) with the aid of the statistical software Microsoft Excel and Sars, and the means compared by Tukey test at 5% probability. The results found revealed that the promotion of tomato root growth by *Serratia* sp. it is similar to that promoted by PEG 7%, differing significantly from the results found with different doses of IAA and clay. The promotion of root growth in tomatoes by *Serratia* sp. and PEG 7% indicate, in part, a physical effect, since the water restriction imposed by the PEG molecule decreases the water movement capacity by increasing the solute concentrations in the exogenous environment (colloidal stress), a fact also observed by bacteria, by colonizing plant tissues and cells - biofilm formation, and consequently reduced hydraulic conductivity of water through the root. Conclusions, ENA 4593 strain of *Serratia* sp. causes tomato root to grow, affecting root morphology and this can be partially explained by a physical effect of PEG and the stimulus to promote root growth in tomato produced by the bacterium cannot be reproduced by auxin, suggesting that the mechanism of promotion growth factor is not associated with this phytohormonium.

Key words: Water stress, *Serratia* sp., tomato.

LISTA DE FIGURAS

| | Pag. |
|---|------|
| Figura 1: Compostos bioativos secretados por rizobactérias promotoras de crescimento em plantas. | 05 |
| Figura 2: Rota da biossíntese do etileno. | 19 |
| Figura 3: As principais rotas de biossíntese de metabolismo secundário em plantas. | 22 |
| Figura 4: Sistema de iluminação instalado sob a bancada do Laboratório de Botânica da USS/Vassouras (A) controlado por um Timer Digital da Marca Exatron (B). | 28 |
| Figura 5: Valores de temperatura máxima, mínima e média registrados durante o período experimental, equivalentes aos dias 19 de novembro até 06 de dezembro, em Vassouras-RJ. | 29 |
| Figura 6: Inoculação da estirpe ENA 4593 de <i>Serratia</i> sp. em sementes de tomateiro cv. Santa Clara, com auxílio de um dessecador acoplado à bomba a vácuo no laboratório de Botânica da USS/Vassouras-RJ. | 32 |
| Figura 7: Sementes de tomate cv. Santa Clara Miss Brasil colonizadas pela estirpe ENA 4593 de <i>Serratia</i> sp. | 33 |
| Figura 8: Papel germitest embebido em solução de PEG ₆₀₀₀ (A) e introdução do papel dentro dos tubos de ensaio (B). | 34 |
| Figura 9: Germinação das sementes de tomate Cv. Santa Clara em caixa Gerbox (A e B), Laboratório de Botânica – USS/Vassouras. | 36 |
| Figura 10: Morfologia de plântulas de tomateiro Cv. Santa Clara, após 6º dia do início do experimento <i>in vitro</i> . Representação das variáveis analisadas durante a execução do bioensaio. | 37 |

Figura 11: Avaliação do crescimento radicular do tomateiro *in vitro* com os 41 tratamentos; controle, semente bacterizada e semente com diferentes concentrações de AIA.

Figura 12: Média e desvio padrão ($X \pm DP$) das variáveis analisadas durante a 47 avaliação do efeito da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. e diferentes concentrações de PEG₆₀₀₀. Comprimento radicular líquido (A), Comprimento líquido do hipocótilo (B), Comprimento cotiledonar (C) e Número de raízes laterais.

Figura 13: Média e desvio padrão ($X \pm DP$) das variáveis analisadas durante a 51 avaliação do efeito do isolado ENA 4593 de *Serratia* sp. e diferentes concentrações de AIA. Comprimento radicular líquido (A), Comprimento líquido do hipocótilo (B), Comprimento cotiledonar (C) e Número de raízes laterais, realizados durante o mês de Janeiro de 2015.

Figura 14: Comprimento radicular líquido de plântulas de tomate submetidas à 52 diferentes concentrações de AIA (mmol L^{-1}).

Figura 15: Crescimento da raiz principal de plântulas de tomateiro após 6 dias do início 53 dos tratamentos com sementes sem inóculo (Testemunha), sementes com PEG₆₀₀₀ (PEG 7%), sementes com inóculo (Bactéria) e sementes com vermiculita (Argila).

Figura 16: Média e desvio padrão ($X \pm DP$) das variáveis analisadas durante a 54 avaliação da promoção de crescimento em plântulas de *Solanum lycopersicum* submetidas a diferentes tratamentos: Controle, PEG 7%, *Serratia* sp., Argila e AIA 10^{-3} mmol L^{-1} . Comprimento radicular líquido (A), Comprimento líquido do hipocótilo (B), Comprimento cotiledonar (C) e Número de raízes laterais, realizados durante o mês de Julho de 2014.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Equação obtida a partir da curva de calibração e os respectivos valores do 30 coeficiente de Regressão R^2 . Valores da transmitância calculada para obtenção de uma suspensão ajustada para 10^8 UFC⁻¹ml.

Tabela 2: Médias do comprimento radicular líquido de *Solanum lycopersicum* L. tratadas 49 com concentração de PEG 7%; PEG 21% e isolado ENA 4593 de *Serratia* sp.

Tabela 3: Habilidade da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. em produzir AIA comparado 49 com outras bactérias da bacterioteca do laboratório de Genética e Bioquímica-Agrobiologia- Seropédica/RJ.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO

| | Pág. |
|--|------|
| 1.INTRODUÇÃO | 1 |
| 2.REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1. Microrganismos benéficos ao tomateiro | 2 |
| 2.2. Principais gêneros de microrganismos benéficos ao tomateiro | 7 |
| 2.2.1. Gênero <i>Pseudomonas</i> | 8 |
| 2.2.2. Gênero <i>Azospirillum</i> | 9 |
| 2.2.3. Gênero <i>Streptomyces</i> | 10 |
| 2.2.4. Gênero <i>Bacillus</i> | 10 |
| 2.2.5. Gênero <i>Azotobacter</i> | 11 |
| 2.2.6. Gênero <i>Burkholderia</i> | 12 |
| 2.2.7. Gênero <i>Acinetobacter</i> | 12 |
| 2.2.8. Gênero <i>Serratia</i> | 13 |
| 2.3. Promoção de crescimento vegetal mediados por microrganismos endofíticos | 14 |
| 2.3.1. Promoção de crescimento através do efeito físico nas raízes | 14 |
| 2.3.2. Promoção de crescimento em plantas via produção de auxina por bactérias | 16 |
| 2.3.3. Interação planta-bactéria via produção da enzima ACC-deaminase | 17 |
| 2.3.4. Biofertilização | 20 |
| 2.3.5. Fitorremediação | 21 |
| 2.3.6. Produção de metabólitos secundários por endófitos | 22 |
| 2.4. Estresses Ambientais | 25 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1. Adaptação de câmara de crescimento | 28 |
| 3.2. Efeito da inoculação com estirpe ENA 4593 e do tratamento com PEG₆₀₀₀ em sementes de tomate cv. Santa Clara (Experimentos I e II) | 30 |
| 3.2.1. Preparo do inóculo | 30 |
| 3.2.2. Desinfestação das sementes | 31 |
| 3.2.3. Tratamento das sementes | 31 |
| A. Inoculação à vácuo | 31 |

| | |
|---|-----------|
| B. Tratamento com diferentes concentrações de PEG ₆₀₀₀ | 33 |
| i. Experimento I: 6%, 7% e 8% de PEG ₆₀₀₀ | 33 |
| ii. Experimento II: 7% e 21% de PEG ₆₀₀₀ | 35 |
| 3.2.4. Germinação das sementes | 35 |
| 3.2.5. Cultivo de sementes germinadas <i>in vitro</i> em câmara de crescimento | 36 |
| 3.2.6. Parâmetros avaliados | 37 |
| 3.2.7. Análise estatística | 38 |
| 3.3. Avaliação do fitormônio Ácido Indol-acético (AIA) no crescimento do | 38 |
| tomateiro (Experimento III) | |
| 3.3.1. Determinação de AIA e compostos indólicos produzidos pela ENA 4593 | 38 |
| 3.3.2. Preparo do inóculo | 39 |
| 3.3.3. Desinfestação das sementes | 39 |
| 3.3.4. Tratamento das sementes | 40 |
| A. Inoculação à vácuo | 40 |
| B. Tratamento com diferentes concentrações de AIA | 40 |
| 3.3.5. Germinação das sementes | 41 |
| 3.3.6. Cultivo de sementes germinadas <i>in vitro</i> em câmara de crescimento | 42 |
| 3.3.7. Parâmetros avaliados | 42 |
| 3.3.8. Análise estatística | 43 |
| 3.4. Avaliação do estresse coloidal promovido por argila no crescimento do | 43 |
| tomateiro (Experimento IV) | |
| 3.4.1. Preparo do inóculo | 43 |
| 3.4.2. Desinfestação das sementes | 43 |
| 3.4.3. Tratamento das sementes | 43 |
| A. Inoculação à vácuo | 43 |
| B. Tratamento com 7% de PEG ₆₀₀₀ | 44 |
| C. Tratamento com argila | 44 |
| 3.4.4. Germinação das sementes | 44 |
| 3.4.5. Cultivo de sementes germinadas <i>in vitro</i> | 44 |
| 3.4.6. Parâmetros avaliados | 45 |
| 3.4.7. Análise estatística | 45 |

| | |
|--|----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4.1. Bioensaios | 45 |
| 4.1.1. Resposta das diferentes concentrações de PEG sobre a plântula de tomateiro X Efeito da bactéria <i>Serratia</i> sp. | 45 |
| 4.1.2. Avaliação do fitormônio AIA no crescimento do tomateiro X Efeito da bactéria <i>Serratia</i> sp. | 49 |
| 4.1.3. Efeito do estresse coloidal imposto por argila no crescimento do tomateiro | 53 |
| 5. CONCLUSÕES | 56 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |

1. INTRODUÇÃO

Atualmente tem se buscado alternativas que minimizem o trabalho no campo, aumentando o rendimento das cultivares e diminuindo o impacto no meio ambiente. Compreender as interações de bactérias com plantas e o papel dos microrganismos no ciclo de vida das plantas é fundamental para se obter uma agricultura limpa (Szentes et al., 2013).

Uma das alternativas que vem demonstrando efeitos benéficos é a aplicação de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) ou rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP). As RPCPs são bactérias do solo que habitam o entorno da raiz, e estão direta ou indiretamente envolvidas na promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas através da produção e secreção de várias substâncias químicas reguladoras. Geralmente, as rizobactérias facilitam diretamente o crescimento das plantas, por meio de qualquer assistência à aquisição de recursos minerais essenciais, tais como, nitrogênio e fósforo ou por modulação de níveis de hormônios vegetais. Indiretamente, o crescimento pode ser promovido via diminuição dos efeitos inibitórios de diversos agentes patogênicos que atuam como agentes de biocontrole (Ahemad & Kibret, 2014).

Dentro desse grupo destacam-se as bactérias endofíticas (BEs), que conferem benefícios aos vegetais, por estarem colonizando os tecidos internos sem competir com outros nichos pela disponibilidade de nutrientes. Além disso, a eficiência da produtividade desses grupos de microrganismos promotores de crescimento em plantas pode ser aplicada ao plantio de culturas dentro de agrossistemas, reduzindo a dependência do uso de agrotóxicos. O trabalho de Hungria (2011) ilustra bem a aplicabilidade citada acima, quando descreve estudos pioneiros que resultaram nas primeiras estirpes de *Azospirillum* autorizadas para a produção de inoculantes comerciais para gramíneas no Brasil.

A compreensão dos diferentes mecanismos que regulam a promoção de crescimento em plantas por rizobactérias constituem a chave da complexa interação entre planta-hospedeiro. Os benefícios promovidos por alterações morfológicas e fisiológicas da planta ou mesmo por competição, protegendo a planta contra patógenos, podem ser observados quando ocorre a colonização por esses microrganismos.

A investigação e o aumento no número de pesquisas relacionadas à compreensão dos mecanismos de promoção de crescimento, mediados por BPCPs, abriria o caminho para descobrir mais estirpes de bactérias eficientes que atuariam em diferentes condições

agroecológicas, bem como aliviaria os efeitos negativos impostos por estresses ambientais (Kavamura et al., 2013).

Segundo Zhang e Huang (2013), elucidar os mecanismos endógenos que confere resistência aos estresses ambientais, bem como compreender os fatores que estão associados à promoção de crescimento em plantas, é o caminho para se utilizar eficientemente os benefícios advindos da colonização desses microrganismos.

Baseando-se nas evidências apresentadas acima, o presente trabalho de tese ao investigar a promoção de crescimento em mudas de tomateiro por *Serratia* sp. pretende elucidar as seguintes hipóteses: a resposta ao incremento radicular promovido por *Serratia* sp. é semelhante ao promovido pela molécula de Polietileno Glicol 6000 (PEG₆₀₀₀), Ácido indolacético (AIA) e Argila; e o mecanismo de aumento de tolerância à seca é devido ao postergamento do estabelecimento da seca “*delayed stress onset*”.

Sendo assim, esse estudo tem por objetivos, verificar os mecanismos de promoção de crescimento associados à estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp., comparar os possíveis efeitos do estresse hídrico sobre o tomateiro com os efeitos promovidos a partir da inoculação da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp., a fim de verificar o potencial desse microrganismo como uma alternativa sustentável para a aplicação de uma agricultura limpa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos benéficos ao tomateiro

O tomate é a segunda hortaliça em importância econômica do mundo, sendo superada apenas pela batata (IBGE, 2014). Segundo Chaves (2009), o Brasil é responsável por 3% da produção global de tomate.

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertence a família das Solanáceas, tem sua origem na zona andina da América do Sul, mas foi domesticado no México e introduzido na Europa em 1544 (Naiaka et al., 2006).

A tomaticultura tem se destacado na economia brasileira não só pelo seu valor econômico, mas também por ser uma atividade geradora de grande número de empregos. O tomate é uma olerícola com alta demanda de consumo em nível nacional, apenas sendo superado pela batata e sucedido pela cebola. Essa alta demanda se dá provavelmente devido à

sua versatilidade na alimentação, consumido tanto “*in natura*”, como cozido ou industrializado (Gonçalves, 2010).

Durante muitos anos, novas tecnologias descobertas pela pesquisa foram incorporadas ao cultivo de tomate em função da necessidade de se obter frutos em maior quantidade e melhor qualidade, e redução de custos de produção a fim de abastecer um mercado consumidor crescente (Cararo & Duarte, 2002).

O cultivo do tomate requer uma série de desafios, pois durante o seu ciclo é acometido por mais de duzentas doenças, o que leva a um declínio na sua produtividade. Assim sendo, a cultura do tomate é uma das que mais demanda o uso de agrotóxicos durante seu processo de cultivo, representando ônus ao produtor e riscos ao consumidor no que tange a resíduos nos produtos finais consumidos (Jones et al., 1991).

Um dos principais objetivos da agricultura é a produção de alimentos de alta qualidade, seguros e baratos para uma crescente população mundial. Porém, existem inúmeros problemas associados ao uso de agroquímicos sintéticos tais como impactos negativos na saúde e no ambiente, além da resistência de plantas à patógenos, pragas entre outros. Isto tem levado a busca por insumos que possam gerar menor impacto ao meio ambiente. Dentre estes, destacam-se o uso de microrganismos benéficos para melhorar a saúde das plantas e a produtividade, garantindo a segurança do consumo humano e a proteção do ambiente (Flores, 2008).

No âmbito da agricultura sustentável, certos grupos de organismos podem beneficiar mais de uma cultura num sistema de rotação no campo e misturas de rizobactérias e micorrizas podem, além da ação direta, atuar indiretamente melhorando a agregação do solo. Todo este potencial existente precisa ser melhor estudado para que a escolha de estratégias adequadas resulte no sucesso da utilização desta nova alternativa em biotecnologia (Mariano et al., 2004).

De acordo com Romeiro (2007) os microrganismos benéficos são grupos de microrganismos capazes de promover o crescimento do vegetal, ou controle biológico contra patógenos, podendo ser dividido em três categorias de microrganismos: rizobactérias, residentes no filoplano e as endofíticas.

A primeira categoria refere-se às RPCPs que constituem um grupo muito amplo de microrganismos, uma vez que sob essa designação incluem-se quaisquer bactérias que vivam na rizosfera e afetem benéficamente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (Silveira & Freitas, 2007).

As RPCPs podem ser encontradas no solo livre, porém são prevalentes na rizosfera das plantas estimuladas pelos exsudatos radiculares ricos em compostos de carbono e nitrogênio. Também podem colonizar a superfície das raízes (epifíticas), se estabelecerem nos espaços intercelulares do córtex, atravessar a endoderme e chegar até o cilindro central, colonizar os vasos condutores sem causar prejuízo à planta hospedeira (endofíticas), podendo ser encontradas em flores e frutos (Dimkpa et al., 2009) e sementes (Gonzaga da Silva, 2008).

Muitas bactérias do solo e da rizosfera podem especialmente estimular o crescimento das plantas na ausência de um patógeno, afetando diretamente o seu metabolismo. Estas bactérias pertencem a diversos gêneros, podendo destacar *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Anahaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcos*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Hydrogenophaga*, *Kluyvera*, *Microcoleus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* e *Vibrio* e incluindo o gênero *Rhizobium*- associação simbiótica com leguminosas (Bashan & Bashan, 2005).

Recentemente podemos observar um crescente aumento de pesquisadores como por exemplo, Barretti et al. (2008), Lopes (2009), Baldotto et al. (2010), Bordiec et al. (2011) e Bhattacharyya & Jha (2012) investigando os efeitos da promoção de crescimento por rizobactérias. A compreensão dos diferentes mecanismos que regulam a promoção de crescimento em plantas é a chave da complexa interação entre microrganismos-planta.

As rizobactérias podem atuar de duas formas na promoção de crescimento, uma via direta e outra indireta. A via direta afeta o metabolismo das plantas, onde a bactéria fornece para as plantas, substâncias que geralmente são escassas no rizoplano. Essas substâncias podem ser disponibilizadas através da fixação biológica do nitrogênio (FBN), solubilização de fósforo e ferro, produção de fitormônios, além da tolerância a estresses, como seca, salinidade alta, toxicidade de metais e resistência a herbicidas (Bashan & Bashan, 2005). Ainda segundo Dimkpa et al. (2009), as rizobactérias podem fornecer a planta “bioproteção”, aumentando a resistência da planta a fatores de estresse biótico e abiótico (Figura 1).

A segunda via de promoção de crescimento das plantas estaria associada ao biocontrole, impedindo os efeitos deletérios de microrganismos fitopatogênicos (bactérias, fungos e vírus) e produzindo substâncias que prejudicam ou inibem outros micróbios (antibiose), ou ainda competindo por disponibilidade de nutrientes (Bashan & Bashan, 2005) (Figura 1).

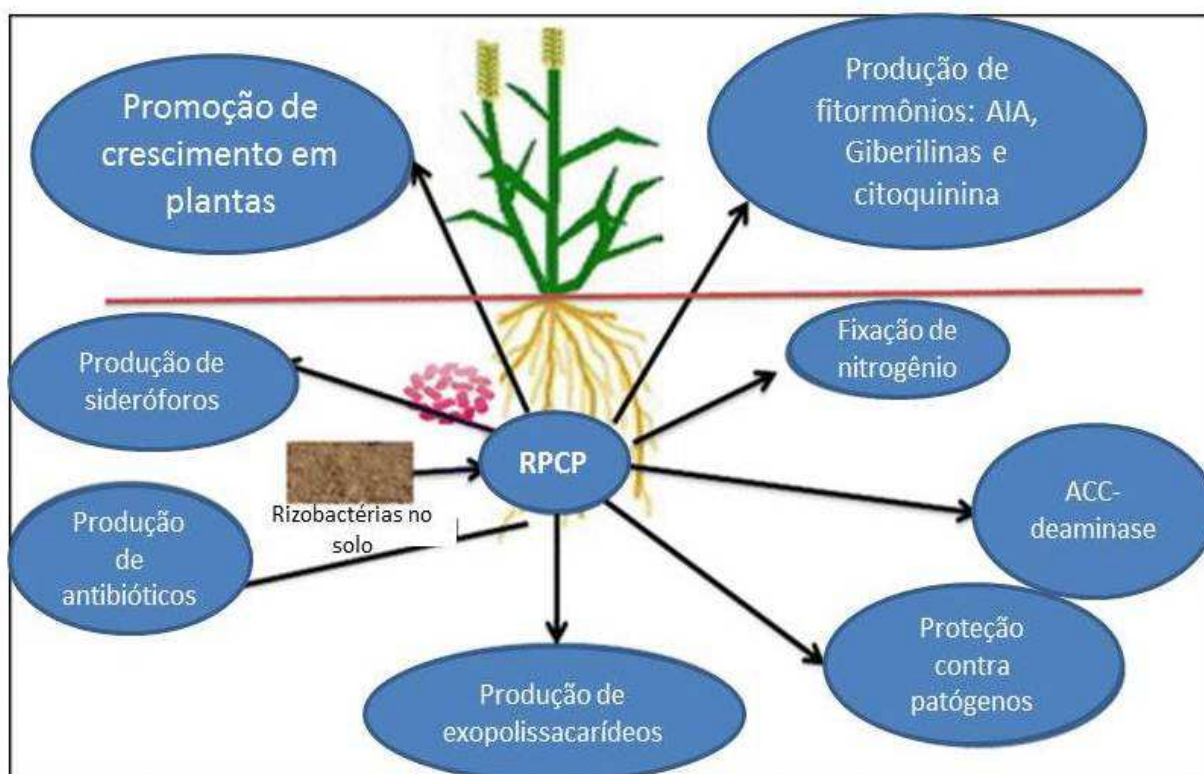


Figura 1: Compostos bioativos secretados por rizobactérias promotoras de crescimento em plantas.

Os efeitos na promoção de crescimento em plantas induzidos por rizobactérias são visíveis na arquitetura da planta, dentre eles podemos destacar: o aumento na altura, na biomassa da parte aérea, no caule, na raiz e na formação de pêlos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema, no tempo de aclimatização, na maior sobrevivência das mudas, ou seja, um aumento na produtividade (Mariano et al., 2004; Sturtz, 1995).

A segunda categoria inclui os microrganismos residentes no filoplano, que recebem esta designação devido ao fato de colonizarem a superfície foliar das plantas, e ali conseguirem sobreviver e se multiplicarem (Beattie & Lindow, 1999), podendo atuar como antagonistas à fitopatógenos ou indutores de mecanismos de defesa intrínseco da planta (Junior et al., 2009).

As populações de microrganismos encontrados no filoplano são geralmente, leveduras, fungos e bactérias que estão constantemente sujeitos às influências ambientais, tendo que desenvolver diferentes mecanismos de sobrevivência e colonização na filosfera (Junior et al., 2009; Filho, 2008; Romeiro, 2007).

A colonização da filosfera por esses microrganismos está associada a variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência de radiação, disponibilidade de nutrientes, pois a variação desses fatores neste habitat faz com que predominem em determinados sítios específicos do filoplano, como por exemplo a base do tricoma, estômatos, hidatódios e ao longo das nervuras (Filho, 2008). Além disso, esta distribuição varia de acordo com as estações do ano ou estádios de desenvolvimento das folhas, já que o ambiente e a composição dos exsudatos foliares favorecem ou limitam o desenvolvimento de certas espécies (Junior et al., 2009).

Os microrganismos residentes no filoplano são considerados benéficos devido ao fato de atuarem como agentes de biocontrole de fitopatógenos (antagonistas) e induzirem a resistência sistêmica (IRS) do vegetal. Os antagonistas residentes (antibiose) exercem o controle biológico clássico através da produção de substâncias antimicrobianas (Bashan & Bashan, 2005). Além disso, há evidências que esses microrganismos realizem parasitismo direto, competição por nutrientes e IRS (Haefeld-Vieira et al., 2001, 2004, 2006). Porém, essa população está constantemente sujeita as variações dos ambientes, tendo que desenvolver vários mecanismos adaptativos que possibilitem a sua sobrevivência na filosfera (Junior et al., 2009).

Segundo Filho (2008) apesar da dinâmica associada ao estabelecimento de microrganismos que colonizam o filoplano, podemos destacar os gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter* que atuam como fixadoras de nitrogênio biológico (FBN).

A última categoria de microrganismos benéficos ao tomateiro é o subgrupo das bactérias endofíticas. Os microrganismos endofíticos são comumente definidos, como as populações de bactérias que habitam os tecidos internos da planta, e têm sido isolados a partir de uma grande diversidade de plantas, onde estabelecem relações não patogênicas com os seus hospedeiros (Qin et al., 2011, Nissinen et al., 2012). Kusari et al. (2012) afirmam ainda que endófitos constituem um grupo extremamente variado de microrganismos ubíquos nas plantas e mantêm uma associação com os seus hospedeiros, pelo menos, durante uma parte do seu ciclo de vida. Essas bactérias penetram nas plantas através das sementes, aberturas naturais (hidatódios, lenticelas, etc.), ferimentos naturais (emergência de raízes laterais), ferimentos em geral induzidos por fatores bióticos (fungos, nematóides) e abióticos (temperatura, transplantio, etc.) e ativamente pela produção de enzimas hidrolíticas (celulase e pectinase) (Michereff & Barros, 2001).

Segundo Sobral (2003), a habilidade das endofíticas de sobreviver dentro dos tecidos vegetais com nenhuma ou pouca competição microbiana faz delas candidatas potenciais a aplicações biotecnológicas.

As BEs não estão sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorre no solo da rizosfera e têm maior eficiência uma vez que, ao contrário das colonizadoras de rizosfera, já estão internamente no sistema radicular, onde os compostos bioativos por elas sintetizados encontram-se prontamente disponíveis às plantas. A associação BE-planta consiste numa interação íntima, na qual a planta fornece os nutrientes e habitat, enquanto a bactéria irá promover o crescimento da planta. Na maioria dos gêneros de bactérias endofíticas, a produção de auxinas, etileno e citocininas, o aumento da absorção de água e nutrientes bem como a supressão de microrganismos deletérios são responsáveis pelo crescimento da planta (Mariano et al., 2004).

2.2. Principais gêneros de microrganismos benéficos ao tomateiro

Um dos elementos mais valiosos na agricultura sustentável é o uso de alternativas que garantam a eficiência dos sistemas de cultivo, gerando menor ou nenhum impacto sobre o meio ambiente. As plantas podem ser consideradas um microecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de bactérias (Sobral, 2003).

Os efeitos da inoculação de bactérias nas sementes e raízes incluem vários benefícios, dentre eles podemos destacar: proteção contra patógenos de raiz, produção de substâncias biologicamente ativas (como auxinas e giberelinas), transformação de minerais inviáveis e compostos orgânicos em formas viáveis para as plantas e, ainda, possibilidade de fixação de nitrogênio (Broadbent et al., 1977).

O trabalho desenvolvido por Alfonso et al. (2005) revelou que os gêneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* e *Actinomyces*, fazem parte da comunidade microbiana do tomate, sendo o gênero *Azospirillum* o mais abundante. Além disso, os resultados encontrados pelo autor revelam a eficiência da inoculação dessas rizobactérias, através do crescimento das plântulas de tomateiro e melhorias no status nutricional da planta, atingindo um rendimento superior a 11% quando comparados com a testemunha.

2.2.1. Gênero *Pseudomonas*

As espécies de *Pseudomonas fluorescens* são bactérias gram-negativas capazes de produzir pigmentos verde-amarelo fluorescentes, observados em radiação ultravioleta (UV). Esses microrganismos podem ser encontrados em diferentes nichos, inclusive água e solo, possibilitados por habilidade de adaptação a diferentes ambientes (Coelho, 2006).

Os primeiros trabalhos realizados com rizobactérias promotoras de crescimento no Brasil testaram *Pseudomonas* fluorescentes para aumentar o crescimento de plântulas de tomateiro e cafeeiro em condições de casa de vegetação. Desde então, vários estudos têm avaliado o efeito benéfico da utilização dessas bactérias (Mariano, 2004).

Segundo Muhammadb et al. (2007), *Pseudomonas fluorescens* também produzem a enzima ACC-deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase) precursora do etileno. A atividade da ACC-deaminase é fundamental na manutenção do desenvolvimento e crescimento do vegetal submetido a condições de estresse, minimizando os efeitos da produção do gás etileno. Ultimamente, têm sido feitos testes para introduzir genes ACC desaminase em plantas e regular níveis de etileno nas plantas para melhor crescimento, especialmente em condições de estresse.

Segundo Glick (2003) podemos destacar dentro do gênero *Pseudomonas*, três espécies que estão associadas a mecanismos de proteção a estresses abióticos em plantas, são elas: *P.fluorescens*, *P.putida* e *P.syringae*. No trabalho de fitorremediação desenvolvido pelo autor, a combinação de plantas resistentes a contaminação do solo com bactérias promotoras de crescimento do gênero *Pseudomonas*, propiciou um aumento significativo tanto no número de sementes que germinaram bem como o aumento da biomassa das plantas. Ainda segundo o autor, esses efeitos foram possibilitados pela inibição da produção de etileno no vegetal, mediados pelas bactérias promotoras de crescimento.

A opção pelo controle biológico, através da introdução ou manejo de bactérias antagonicas, como as *Pseudomonas fluorescens*, nos locais de colonização do patógeno, é um processo econômico que tem se mostrado bastante promissor. A ação antagonista desses microrganismos é um eficiente mecanismo de ação; promovendo o crescimento de plântulas, bem como apresentam excelente sobrevivência e colonização na rizosfera/rizoplano de plantas (Peixoto, 1997). Algumas dessas bactérias podem através da mineralização de nutrientes, aumentam a disponibilidade de nutrientes como o fósforo e ferro, promovendo o crescimento das plântas pela absorção desses elementos mais disponíveis (Silveira, 2001).

Segundo Hadar & Papadopoulou (2012) a espécie *Pseudomonas aeruginosa* têm o potencial de suprimir as doenças causadas por espécies de *Fusarium* através da produção de antibióticos. O trabalho de Strobel et al.(2004) ilustra bem esse caso, onde espécies do gênero *Pseudomonas* foram capazes de produzir pseudomicinas, um antibiótico potente utilizado na agricultura para controle do fungo fitopatogênico *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da doença sigatoka negra em bananas.

No trabalho realizado por Siddiqui (2004) para avaliar a influência das espécies *Pseudomonas fluorescens* em adubos orgânicos (compostagem de esterco de vaca, esterco de cavalo, cabra esterco e esterco de aves) isoladamente e/ou combinação com a multiplicação de *Meloidogyne incognita* e crescimento do tomateiro, revelou que a bactéria *Pseudomonas fluorescens* induziu o crescimento de tomate e reduziu a multiplicação de nematóides.

2.2.2. Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* compreende as bactérias pertencentes a subclasse α das proteobactérias, bacilos gram-negativos, aeróbicos, flagelados e fixadores de nitrogênio (Fritsch, 2011).

Espécies do gênero *Azospirillum* são consideradas rizobactérias promotoras de crescimento, devido à sua capacidade de estimular o crescimento das plantas pela produção de reguladores de crescimento, redução do potencial de membrana das raízes, síntese de enzimas, solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico (Kuss, 2006, Hungria, 2011). Indiretamente, promovem o crescimento vegetal reduzindo ou prevenindo a ação de microrganismos patogênicos, devido à produção de antibióticos e sideróforos (Rodriguez & Fraga, 1999).

As auxinas são um conjunto de moléculas que são consideradas os fitormônios mais importantes produzido por *Azospirillum* e outros gêneros bacterianos, dos quais o ácido indolacético (AIA) é o mais ativo e melhor caracterizado (Crozier et al., 1988).

Siddiqui (2004) desenvolveu seus experimentos com alguns gêneros de rizobactérias endofíticas, entre elas a espécie *Azospirillum brasiliensis*, revelando a sua eficiência na promoção de crescimento através da redução do número de nematóides no tomateiro.

2.2.3. Gênero *Streptomyces*

As bactérias do gênero *Streptomyces* pertencem ao grupo dos actinobactérias que são bactérias filamentosas, gram-positivas, não patogênicas (Oliveira, 2003; Silva et al., 2009) capazes de habitar a rizosfera de plantas, podendo assim ser consideradas como rizobactérias (Carrer Filho et al., 2009).

O potencial das actinobactérias está associado ao fato desses microrganismos serem capazes de produzir uma diversidade de compostos sintetizados e excretados, especialmente os antibióticos, que os torna especialmente desejados como agentes de biocontrole. Outra característica importante dessas bactérias é a capacidade de sintetizar conídios, o que facilita a sua formulação em condições laboratoriais (Emmert & Handelsman, 1999).

Os resultados encontrados no trabalho de Carrer Filho et al. (2009) elucidam a eficiência do isolado (*Streptomyces setonii*) como um promissor agente de biocontrole no tomateiro sendo capaz de revelar em testes de antagonismo *in vitro* contra patógenos, inibição do crescimento de bactérias (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*), além de inibir a germinação de conídios de alguns fungos (*Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassiicola*, *Stemphylium solani*).

2.2.4. Gênero *Bacillus*

Bactérias do gênero *Bacillus*, são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas gram-positivas ou gram variáveis, produtoras de endósporos, que lhes conferem resistência ao estresse ambiental. Além disso, esses microrganismos são capazes de promover o crescimento em plantas, através da produção de hormônios, sideróforos, antibióticos e solubilização de fosfatos, sinalizadores moleculares (Silveira, 2008).

A espécie *Bacillus subtilis* tem se destacado no cenário das rizobactérias promotoras de crescimento em plantas, por propiciar a indução de resistência sistêmica (IRS) em tomate (Araújo & Menezes, 2009).

Segundo Neto et al. (2002) a indução de resistência sistêmica é um importante mecanismo de controle de doenças, induzindo a planta através da penetração ativa do microrganismo, a sintetizar compostos bioativos que atuem sobre os fitopatógenos ou alterem

funções morfofisiológicas, como por exemplo síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada de patógenos na planta hospedeira.

As bactérias do gênero *Bacillus* sp. podem mitigar o estresse biótico pela supressão dos microrganismos competidores, provavelmente fitopatógenos, através da produção de antibióticos (Choudhary et al., 2011). Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com as mudanças na atividade, de enzimas-chaves no metabolismo primário e secundário. Neste contexto o grupo de peroxidases representa um papel importante na defesa das plantas (Araújo & Menezes, 2009).

No trabalho desenvolvido pelo autor acima, foi observado o aumento da produção de peroxidases nos tecidos de plantas inoculadas com *B. subtilis*, quando comparadas com o controle. Além disso, a comprovação do efeito indutor contra patógenos foliares de tomate deste isolado aumenta o elenco de efeitos benéficos descrito para a espécie *B. subtilis* o que credencia o mesmo para avaliações em condições de campo.

2.2.5. Gênero *Azotobacter*

As bactérias do gênero *Azotobacter* são bastonetes gram-negativos, não patogênicas, fixadores de nitrogênio, capazes de sintetizar auxinas, citocininas, giberilinas e substâncias semelhantes, que atuam no controle do crescimento aumentado dos vegetais. Estes hormônios se originam a partir da superfície da rizosfera ou raiz, afetando intimamente o crescimento das plantas superiores. Contudo, para garantir a alta eficácia de inoculantes e fertilizantes microbiológicos, é necessário encontrar os parceiros compatíveis, ou seja, um genótipo da planta particular e uma cepa de azotobactéria especial que vai formar uma boa associação (Mrkovacki & Milic, 2001).

Os efeitos benéficos da inoculação de bactérias do gênero *Azotobacter* no tomateiro foram descritos no trabalho de Azcorn & Barea (1975), onde os resultados revelaram o aumento do crescimento do tomateiro mediante a inoculação e síntese de auxinas, citocininas e giberilinas por esses microrganismos.

2.2.6. Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* foi criado em 1992 e conta atualmente com 36 espécies descritas (Perin, 2007). As bactérias pertencentes a esse gênero pertencem a classe das proteobactérias, com forma de bacilos gram-negativos, não fermentadores de glicose, aeróbicos (Bandeira, 2011).

Colonizam diversos nichos ecológicos, desde plantas, solos contaminados, água e seres humanos, sendo um importante componente da microbiota desses ambientes (Bandeira, 2011). A maioria dessas bactérias é considerada diazotróficas não patogênicas, podendo promover o crescimento de plantas pela fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios (Perin, 2007).

Segundo Behrends et al. (2011) diferentes estirpes da espécie *Burkholderia cenocepacia* apresentaram diferentes respostas metabólicas ao estresse osmótico. As respostas metabólicas e tolerância ao estresse osmótico elucidam o potencial dessas bactérias para proteção contra o estresse osmótico em plantas.

Assim como as *Pseudomonas*, as bactérias do gênero *Burkholderia* são capazes de produzir a enzima ACC-deaminase modulando os níveis de etileno na planta, promovendo assim o seu crescimento (Onofre-Lemus et al., 2009).

Ainda segundo Onofre-Lemus et al. (2009), as espécies do gênero *Burkholderia* são promissoras no que se refere a promoção de crescimento do tomate em condições naturais, devido a sua capacidade de expressar a atividade da enzima ACC-deaminase, além também de fixarem o nitrogênio atmosférico. Nos estudos do autor a espécie *B.unamae* foi a que se destacou em relação aos efeitos citados acima.

2.2.7. Gênero *Acinetobacter*

A bactéria do gênero *Acinetobacter* são bacilos gram-negativos, que se apresentam como coco-bacilos na fase estacionária de crescimento e em meios não seletivos, imóveis, aeróbios estritos, não formadores de esporos. São comumente encontrados no solo onde são capazes de mineralizar compostos aromáticos (Gonçalves, 2010). No trabalho de Gonçalves (2010) a bactéria *Acinetobacter* sp. foi capaz de mitigar o estresse osmótico em plântulas de tomateiro *in vitro*, mostrando-se promissora ferramenta biotecnológica.

O trabalho desenvolvido por Silva (2004) e Silva et al. (2008) as bactérias endofíticas *Acinetobacter johnsonii* e *Bacillus pumilus* foram capazes de reduzir a severidade causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente causadora da pinta preta do tomate.

Segundo Silva (2008) esses endófitos conseguiram apresentar eficiência no controle da pinta bacteriana do tomateiro através da ação antagônica dos mesmos sobre o patógeno.

2.2.8. Gênero *Serratia*

As bactérias pertencentes ao gênero *Serratia* de acordo com a classificação morfotintorial, podem ser definidas como bastonetes, gram-negativos, imóveis, fermentadores de lactose pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

Segundo Kang et al. (2015), López (2012), Zhang *et al.* (2009) e Grimont & Grimont (2006), o gênero *Serratia* é definido pela capacidade de assimilar o carbono através da fermentação da glicose, manitol, maltose, malato, manose, n-acetil-glicosamina, gluconato de potássio, citrato e ácido fenil-acético. Os autores ainda revelam que todas as espécies do gênero *Serratia* apresentam resultados negativos para as reações enzimáticas de produção de urease, arabinose, arginina, degradação da deaminase triptofano e ausência da produção de H₂S.

Esses microrganismos podem ser encontrados em diversos ambientes, como trato intestinal de animais e humanos, água, solo (Nascimento, 2011). Segundo Chen et al. (2010) essa bactéria pode colonizar os tecidos internos dos vegetais, bem como estarem presentes na rizosfera.

A solubilização de minerais inorgânicos indisponíveis no solo é um dos mecanismos de crescimento em plantas promovidos por bactérias do gênero *Serratia*. O fósforo e o zinco por exemplo, são elementos essenciais à planta e sem a sua presença a planta não é capaz de completar o seu ciclo vital. A solubilização de sideróforos por determinados microrganismos em situações de baixa disponibilidade de ferro no ambiente, é possível, pois estes são capazes de quelar e captar Fe³⁺ (íon férrico), transportando o complexo ferro-sideróforo para dentro da célula (Rajkumar et al., 2010).

Swarnalakshmi et al. (2013) ao avaliar a influência dos biofertilizantes na nutrição do trigo a partir da formação de biofilmes com a cianobactéria *Anabaena*, observou que o desempenho do biofilme formado pelo consórcio de bactérias *Anabaena-Serratia* mostrou

maior eficiência na solubilização do fosfato na presença de rocha fosfórica, do que o consórcio *Anabaena-Pseudomonas*. Efeitos semelhantes também foram observados por López (2012) ao realizar testes bioquímicos *in vitro* com isolados de microrganismos da rizosfera de plantas de baunilha, verificando que as bactérias *Serratia* e *Pseudomonas koreensis* foram os isolados que melhor responderam à capacidade de solubilizar o fosfato.

Além do aumento na capacidade de absorção dos nutrientes minerais, outro benefício que podem ser observado pela infecção de plantas com a bactéria endofítica *Serratia nematodiphila* é a redução da fitotoxicidade por metais pesados. Os resultados encontrados por Wan et al. (2012), revelaram que houve uma alteração na absorção de nutrientes e no metabolismo do oxigênio ativo em plantas colonizadas com esses endófitos, levando a crer que esses benefícios possivelmente estariam associados a redução do efeito da intoxicação por cádmio (Cd).

A promoção de crescimento em plantas promovido por *Serratia*, também pode ser realizado através de produção de antimicrobianos. No trabalho desenvolvido por Malarkodi et al. (2013) a espécie *Serratia nematodiphila* mostrou atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *Bacillus subtilis*, *Klebsiella plantiola* e *Pseudomonas aeruginosa*, através da biossíntese de nanopartículas metálicas. Atualmente a pesquisa da produção dessas moléculas com potencial antimicrobiano está em expansão devido à aplicação biomédica para o crescimento de novas biotecnologias. Outro exemplo, que elucida a aplicabilidade das bactérias do gênero *Serratia* no controle de patógenos (antibiose) é produção de metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* e *Erwinia carotovora*, respectivamente (Szentés et al., 2013).

2.3. Promoção de crescimento vegetal mediados por microrganismos endofíticos

2.3.1. Promoção de crescimento através do efeito físico nas raízes

A investigação dos mecanismos associados à promoção de crescimento em plantas mediados por bactérias é um tema que mobiliza um grande número de pesquisadores, dentre eles podemos citar Dinish et al. (2015), Ahemad & Kibret (2014), Kavamura et al. (2013).

A promoção de crescimento nas raízes induzidos por bactérias através do efeito físico, ainda não tem sido mencionado na literatura, mas os trabalhos desenvolvidos por Asli e

Neumann (2009, 2010a e 2010b) auxiliam a explicar o mecanismo físico como indutor de crescimento em plantas.

Asli e Neumann (2009) foram os primeiros a citar o efeito físico como promotor de crescimento nas raízes. Para isso, os autores supracitados, desenvolveram um ensaio laboratorial, objetivando avaliar o efeito das substâncias derivadas de argila bentonítica e nanopartículas de TiO_2 , presente em suspensões coloidais, no crescimento das raízes de plântulas de milho (*Zea mays L.*). Os resultados encontrados nesse trabalho revelaram que essas suspensões coloidais, uma vez em contato com as raízes, induziam à redução do fluxo de água. A baixa disponibilidade de água causada por essas substâncias levou a uma inibição física rápida do fluxo de água através dos poros da parede celular, promovendo a redução na condutividade hidráulica das raízes.

Resultados similares puderam ser observados quando Asli e Neumann (2010a) verificaram os mecanismos de promoção de crescimento em milho quando estes foram submetidos à presença dos ácidos húmicos (AH). As substâncias húmicas (SH) são compostos orgânicos originados a partir da oxidação e polimerização da matéria orgânica. A presença da matéria orgânica humificada nos solos podem estar associados ao transporte de aglomerados coloidais ou soluções supra-moleculares que influenciam diretamente nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo.

A promoção do crescimento vegetal (bioatividade) induzidas por essas substâncias orgânicas em solução exercem um estímulo químico na arquitetura radicular das plantas, como aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, bem como a produção de biomoléculas reguladoras (Braz et al., 2010).

Além desse efeito químico sabidamente conhecido na literatura, Asli e Neumann (2010a) conseguiram comprovar no seu trabalho com crescimento radicular de plântulas de milho (*Zea mays L.*) que o incremento ao desenvolvimento radicular esteve também associado em parte a um efeito físico dos ácidos húmicos.

Corroborando com a hipótese de que soluções coloidais são capazes de induzir a um efeito físico no transporte de água através do xilema, Asli e Neumann (2010b) utilizaram uma suspensão coloidal formada por polímeros de proteínas inertes (ovoalbumina) para testarem o incremento do crescimento radicular, mediado por efeito físico. As soluções de ovoalbumina foram marcadas com fluorescência a fim de se verificar o efeito físico dessas proteínas conjugadas no transporte do xilema. Ao final do experimento, com auxílio de um microscópio de fluorescência foi possível observar o acúmulo 40% de ovoalbumina nas superfícies da

parede celular da raiz primária e conseqüentemente a inibição do tamanho dos poros da parede celular, reduzindo então a capacidade de transporte de água e a condutividade hidráulica no xilema.

Os efeitos potencialmente estressantes induzidos por soluções coloidais, revelam que o entupimento dos poros da raiz, provocados por esses polímeros, refletem no efeito físico da promoção de crescimento radicular como resposta de adaptação das plantas às condições do estresse imposto.

2.3.2. Promoção de crescimento em plantas via produção de auxina por bactérias

A promoção de crescimento em plantas por rizobactérias está direta ou indiretamente associada à produção e secreção de várias substâncias químicas reguladoras na rizosfera.

Geralmente, esses microrganismos promovem o crescimento do vegetal ao facilitar qualquer assistência na aquisição de recursos minerais essenciais como por exemplo, nitrogênio e fósforo ou por modular níveis de hormônio vegetal (Ahemad & Kibret, 214).

Os hormônios são mensageiros químicos que modulam os processos celulares, interagindo com proteínas específicas que atuam como receptores de transdução de sinais. A auxina foi o primeiro hormônio de crescimento estudado em plantas e muitos trabalhos na área da fisiologia relatam seus efeitos no mecanismo de expansão celular (Taiz e Zeiger, 2013).

A principal auxina de ocorrência natural é denominada de ácido indol-acético (AIA). Mais tarde, várias outras auxinas foram descobertas em plantas superiores, contudo o AIA é incomparavelmente o mais importante na fisiologia e também o mais abundante (Taiz e Zeiger, 2013). Diversos microrganismos, como bactérias e fungos associados às plantas ou livres na rizosfera, sintetizam hormônios de crescimento idênticos aos encontrados nas plantas, dentre eles podemos citar o AIA (Pedrinho et al., 2010).

A habilidade das bactérias promotoras de crescimento de sintetizarem AIA foi descrita no trabalho minucioso de Ahemad & Kibret (2014) que fez uma revisão dos principais mecanismos associados à promoção de crescimento por rizobactérias, destacando os principais benefícios associados à habilidade de promoção de crescimento, através da síntese de fitormônios.

As bactérias do gênero *Serratia* são sabidamente conhecidas pela capacidade de solubilizar fosfato, sideróforos entre outros, contudo, poucos são os trabalhos que elucidam a

produção de fitormônio por essas bactérias, como por exemplo a produção de giberilinas por *Serratia nematodiphila* PEJ 1011 descrita no trabalho de Kang et al. (2015) e AIA por *Serratia nematodiphila* NII-9228 descrita nos estudos realizados por Dastager et al. (2011).

Segundo Farina (2012) a promoção de crescimento radicular é um dos principais benefícios atribuídos às bactérias que produzem AIA. O estabelecimento rápido de raízes é muito vantajoso para plantas jovens. A proliferação do número de raízes viabiliza um melhor ancoramento da planta ao solo, obtendo assim, eficientemente maior absorção de água e outros nutrientes minerais, acentuando as suas chances de sobrevivência.

A biossíntese do AIA está intimamente relacionada ao aminoácido triptofano e ao precursor do triptofano, indol-3-glicerol fosfato. Estudos de genética molecular têm sido desenvolvidos para elucidar as principais enzimas dependentes de triptofano, associadas à biossíntese de AIA, bem como a ordem em que elas atuam nesse processo. Rotas biossintéticas usando triptofano como precursor de AIA em vegetais, também tem sido identificadas na rota bacteriana de biossíntese de AIA (Normaly, 2010 e Taiz e Zeiger, 2013).

2.3.3. Interação planta-bactéria via produção da enzima ACC-deaminase

A compreensão dos diferentes mecanismos que regulam a promoção de crescimento em planta constitui a chave da complexa interação entre planta-hospedeiro.

Os microrganismos benéficos presentes no solo desempenham diversas funções no equilíbrio do ecossistema e na ciclagem de nutrientes, dentre as atividades envolvidas na proteção de plantas, bactérias promotoras do crescimento de plantas podem auxiliar ou induzir o crescimento de plantas e diminuir ou prevenir efeitos danosos de fitopatógenos (Oliveira et al., 2008).

Um dos efeitos que se tem atribuído as BPCPs em termos de promoção de crescimento em plantas são alterações benéficas na morfologia radicular. Segundo Shahzad et al. (2010) os benefícios da produção da enzima ACC-deaminase por bactérias promotoras de crescimento podem ser observados através da influência na modificação da arquitetura da raiz por meio do seu potencial para regular a síntese do etileno nas raízes da planta. O etileno promove a inibição do alongamento da raiz e as bactérias capazes de reduzir ou bloquear a síntese do etileno vão indiretamente promover o crescimento radicular, através da produção da enzima ACC-deaminase (Yang et al., 2009; Romeiro, 2007).

Segundo Oliveira et al. (2008) a redução do aumento do nível do etileno na planta, promove o crescimento do vegetal, pois sistemas radiculares mais desenvolvidos levam a melhor captação de nutrientes e água. Além disso, as associações de bactérias promotoras de crescimento com as raízes das plantas provocam um estado estável de defesa ou indução de resistência sistêmica nas plantas, que tem maior capacidade de induzir o aumento no nível de resistência aos agentes patogênicos, após a exposição a estresses bióticos. Além disso, também podem induzir a tolerância sistêmica (IST) através do aumento da tolerância a estresses abióticos (Bhattacharyya & Jha, 2012).

Dentre as RPCPs envolvidas na indução de tolerância sistêmica de plantas aos estresses osmóticos, destaca-se o grupo das *Pseudomonas*, *Burkholderias*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (Dimkpa et al., 2009).

Segundo Glick et al. (2007) e Muhammadb et al. (2007), as rizobactérias promotoras de crescimento em plantas, podem promover o crescimento do vegetal em condições de estresse ambiental, produzindo a enzima ACC-deaminase. A enzima ACC-deaminase, é responsável pela degradação de ACC (precursor do etileno) em amônia e α -cetobutirato, são capazes de promover o crescimento de plantas através da redução dos níveis do etileno na planta (Hontzeas et al., 2004).

A rizobactéria *Serratia proteamaculans* utilizada no trabalho de Shahzad et al (2010) demonstrou eficácia ao promover o crescimento radicular e nodulação em plantas de *Cicer arietinum* L.(grão-de-bico) mediados pela atividade da enzima ACC-deaminase.

No trabalho desenvolvido por Shahzard et al. (2013) as espécies *Pseudomonas thivervalensis* e *Serratia marcesens* demonstraram eficiência na promoção de crescimento em plantas de milho submetidas a condições axênicas, através da produção de ACC-deaminase.

Os recursos oriundos da aplicação de microrganismos produtores de ACC-deaminase são muito amplos, o trabalho desenvolvido por Rashid et al.(2012) revela que a utilização de estirpes de bactérias endofíticas produtoras de ACC-deaminase podem expressar genes capazes de sintetizar AIA, produzir sideróforos, solubilizar fosfato, aumentar a tolerância ao sal e resistência aos antibióticos.

A resposta das plantas a diferentes formas de estresse, inclusive infecções fitopatogênicas, envolvem a produção endógena do etileno. A percepção destas moléculas pelas células vegetais promove o desencadeamento de diversos processos de resposta a estresse.

O etileno é um gás que atua como fitormônio, desempenhando um papel importante na regulação de processos fisiológicos durante o crescimento da planta. Ele controla muitos estádios do desenvolvimento da planta, tais como germinação das sementes, expansão e diferenciação celular, abscisão e senescência de tecidos vegetais.

Além disso, a ação do etileno na planta pode ser observada em vários processos biológicos da planta, incluindo a nodulação de rizóbio em leguminosas, enraizamento, resposta da planta a metais pesados, ozônio, patógenos e inundações (Glick, 2005).

A via de biossíntese metabólica do etileno está associada à produção do aminoácido metionina que é convertido em S-adenosilmetionina, ACC, mediador intermediário da conversão da metionina em etileno (Medeiro, 2001) (Figura 2). Essa rota é ativada pelo CO₂ e envolve a participação das enzimas ACC-sintase e ACC-oxidase.

Segundo Taiz e Zeiger (2013), a biossíntese do etileno é desencadeada por vários processos, incluindo o estado de desenvolvimento dos vegetais, as condições ambientais, outros hormônios vegetais (auxinas, por exemplo) e lesões físicas e químicas.



Figura 2: Rota de biossíntese do etileno.

2.3.4. Biofertilização

O nitrogênio (N) é um dos principais nutrientes minerais da planta, sendo responsável pela formação de proteínas e várias reações do vegetal, em especial a promoção do crescimento (Bhattacharyya & Jha, 2012).

A fixação biológica de nitrogênio é um dos principais mecanismos desencadeados por rizobactérias. Segundo Perin (2007), as rizobactérias seriam capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, por possuírem o gene *nif*, responsável pela atividade da enzima nitrogenase. A nitrogenase é responsável pela fixação do N₂ no nódulo em condições anaeróbicas (Fagan et al., 2007).

A eficiência da nodulação é mediada por fatores internos (fitohormônios e disponibilidade de fotoassimilação) e externos como temperatura radicular, teor de oxigênio no nódulo, disponibilidade hídrica, disponibilidade de nutrientes (Fagan et al., 2007).

Os níveis de etileno na planta estão associados ao processo de nodulação por leguminosas e produzem um efeito regulatório sobre ele, inibindo a divisão celular (Fei & Vessey, 2004). O etileno é sintetizado na região do periciclo da raiz difundindo-se para o córtex, onde bloqueia a divisão celular (Taiz e Zeiger, 2013).

A habilidade de algumas espécies de rizobactérias em produzir um inibidor da síntese de etileno permite maior capacidade de nodulação nessas espécies. O sequestro e hidrólise desse composto pela enzima ACC-deamiasase produzida pela RPCPs diminui a concentração de etileno nas plantas e conseqüentemente pode estimular o crescimento vegetal e o comprimento das raízes (Glick et al., 2005, 2007).

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

O fósforo é um nutriente de baixa mobilidade e solubilidade no solo uma vez que em geral, encontra-se complexado em compostos ferrosos, cálcio e na matéria orgânica. Algumas bactérias são capazes de promover a solubilização e disponibilização desse nutriente, aumentando assim o crescimento do vegetal. Segundo Cattelan (1999), os principais mecanismos envolvidos na solubilização do fosfato são a produção de CO₂ e ácidos orgânicos, resultantes da mineralização do C, exercendo ação direta sobre os fosfatos inorgânicos; redução de compostos de Fe³⁺ para compostos Fe²⁺, que é mais solúvel e facilmente

assimilável pelas raízes e; produção de H₂S sob baixas concentrações de O₂, que em condições redutoras favorece a solubilização de fosfatos de ferro.

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

2.3.5. Fitorremediação

A fitorremediação é uma tecnologia relativamente nova, que consiste no uso de plantas para a restauração de ambientes contaminados com poluentes. Recentemente, os benefícios da combinação de bactérias endofíticas com plantas para aumento da remediação dos poluentes foram tentados com sucesso para remoção de metais tóxicos de solos contaminados (Rajkumar et al., 2009).

A fitorremediação de solos e ambientes de água contaminada é regulado e coordenado pelo sistema radicular das plantas, no entanto, o crescimento da raiz é muitas vezes inibido pelo estresse induzido pelos poluentes (Arshad et al., 2007). Alternativas que utilizem a promoção de crescimento radicular mediados pela ação da enzima ACC-deaminase tem sido desenvolvido como intuito de contribuir como ferramenta para aumentar a absorção de metais pesados ou rizodegradação de xenobióticos no processo de fitorremediação (Arshad et al., 2007, Zang et al. 2011a, Zang et al. 2011b).

Segundo Zhang et al. (2011a), a utilização da enzima ACC-deaminase obtida a partir de microrganismos endofíticos promotores de crescimento é uma nova alternativa para fazer fitorremediação de ambientes contaminados com metal cobre (Cu). Os estudos realizados pelos autores revelaram a eficácia dos isolados *Ralstonia* sp., *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas thivervalensis* na promoção do crescimento de plantas cultivadas com Cu, através da mobilização do Cu mediada pela atividade da enzima ACC-deaminase.

O aumento da resistência da planta *Commelina communis* cultivada com o metal pesado chumbo (Pb) pode ser observado nos experimentos realizados com inoculação de bactérias endofíticas produtoras da enzima ACC-deaminase. Os resultados revelaram que o mecanismo de promoção de crescimento induzidos através dessa enzima, estavam associados à capacidade das auxinas de promoverem a síntese do etileno (Zhang et al., 2011b).

2.3.6. Produção de metabólitos secundários por endófitos

Os metabólitos secundários são substâncias de natureza orgânica de baixo peso molecular, e possuem atividades biológicas marcantes. Estes diferem dos metabólitos primários, principalmente por apresentarem-se em baixas concentrações e serem produzidos em determinados grupos vegetais (Berg & Lubert, 2008).

Os metabólitos secundários auxiliam na resposta a mecanismos de sobrevivência e adaptação do vegetal, exercendo um papel fundamental na defesa contra herbivoria e fitopatógenos, além de também estarem envolvidos, com a sustentação estrutural, no caso da lignina, ou produção de pigmentos, como as antocianinas.

Segundo García & Carril (2009) o metabolismo secundário permitem as plantas produzir e acumular compostos de diferentes naturezas bioquímicas. Esses compostos derivados do metabolismo secundário se distribuem diferencialmente entre grupos taxonômicos, que apresentam propriedades biológicas, muitos destes desempenham funções ecológicas e se caracterizam por seus diferentes tipos de aplicações como medicamentos, herbicidas, perfumes, entre outros. A rota de biossíntese desses compostos pode ser representada de forma simplificada a partir da figura 3.

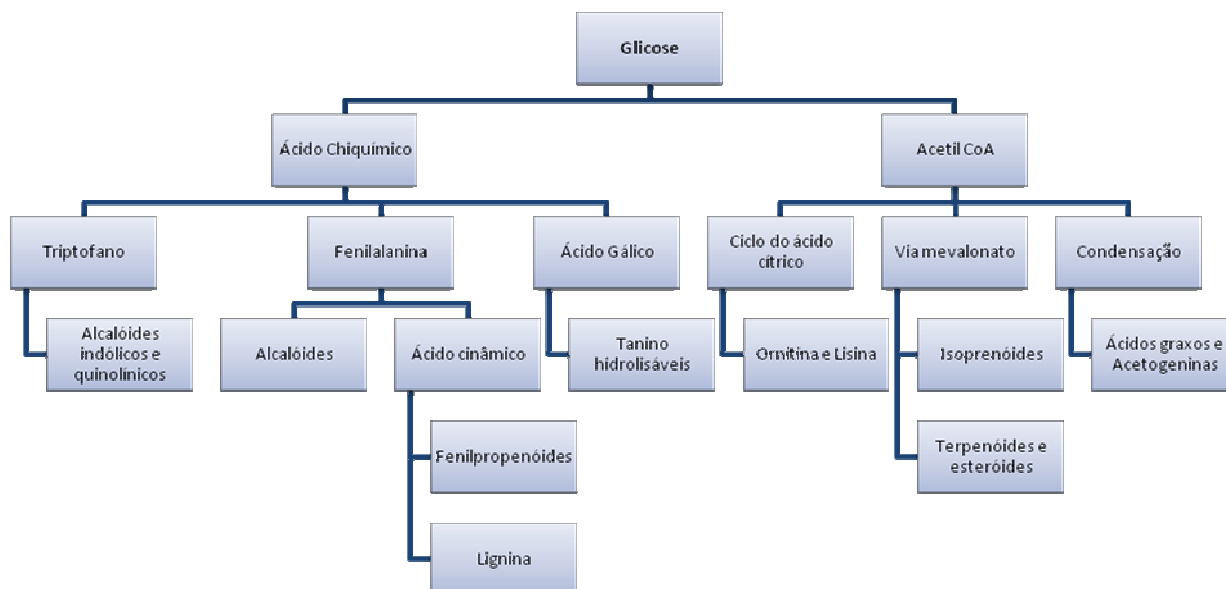


Figura 3: As principais rotas de biossíntese de metabolismo secundário em plantas.

Segundo Joseph & Priya (2011), muitos compostos bioativos naturais tem sido isolados a partir de microrganismos endofíticos. O processo de biotransformação microbiana é um método alternativo para obtenção de novos compostos bioativos fitoquímicos. Vários compostos naturais como alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides, antibióticos e antitumorais produzidos por microrganismos endofíticos foram relatados nos trabalhos de Guo et al. (2008), Qiu et al. (2010) e Aly et al. (2011).

Os terpenóides são tóxicos e na maioria das vezes são utilizados como inibidores de herbívoros, atuando também no crescimento e desenvolvimento da planta através da ação das giberilinas (diterpenos), ácido abscísico (sesquiterpeno), esteróides (triterpenos), fitol (diterpeno). Os compostos fenólicos como flavonóides e antibióticos atuam contra herbivoria e patógenos. Já os alcalóides, glicosídeos, aminoácidos não-protéicos atuam como inibidores de proteinases protegendo a planta como herbívoros (Taiz & Zeiger, 2013).

Tiwari et al (2013), Santos et al. (2013), Joseph & Priya (2011), Esposito-Polesi (2011), Qin et al.(2011), Chapla et al. (2013) são alguns, dos muitos autores, que vem desenvolvendo trabalhos com microrganismos endofíticos a fim de melhor compreender as interações estabelecidas com as plantas, tendo como consequência a produção de metabólitos secundários.

Segundo Nissinen et al. (2012), as composições das comunidades bacterianas endofíticas são dependentes das espécies de plantas hospedeiras. Vários gêneros de bactérias foram encontrados fortemente associados com espécies de plantas hospedeiras específicas. Acredita-se que os metabólitos secundários bioativos produzidos por esses microrganismos possam estar diretamente associados com a planta hospedeira através da recombinação gênica entre as espécies durante a fase evolutiva (Conti et al. 2012).

Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Araujo, 1996).

Por tanto, os endófitos produzem diferentes metabólitos que afetam a interação da planta hospedeira com o meio ambiente. Estas moléculas exercem atividade de hormônios, antibióticos, antitumorais entre outras funções biológicas, apresentam grande interesse industrial e biotecnológico, sendo por esse motivo alvo de importantes investigações na área da pesquisa (Kursari et al, 2012, Neto et al., 2002). Entretanto, ainda existem várias lacunas no que tange à compreensão e aplicabilidade dos endófitos como uma fonte abundante e de

confiança de novos compostos quimicamente bioativos, com potencial para a exploração de uma variedade de produtos de interesse nas áreas médicas, farmacêuticas e agrícolas (Kusari et al., 2012, Joseph & Priya, 2011).

Segundo Targa et al. (2011), o aumento no interesse por métodos de controle biológico baseados no uso de microrganismos endofíticos, vem aumentando pois estes colonizam o interior de plantas protegendo-as contra pragas e patógenos, direta ou indiretamente pela produção de metabólitos, que podem ser usados como método alternativo ao controle químico e integrado com outros métodos.

Essa ação controladora pode ocorrer através de diversos mecanismos, tais como: **antibiose** (produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos), **competição** (espaço físico, Fe^{+3} e outros nutrientes), **parasitismo**, **IRS** e **proteção cruzada** (Mariano et al., 2004).

Bulgari et al. (2011) observou nos seus estudos que a recuperação da planta videira após infecção por fitopatógenos esteve associada a presença de micro-organismos endofíticos, protegendo a planta contra patógenos, através da IRS.

Segundo Neto et al. (2002), a IRS é um importante mecanismo de controle de doenças, induzindo a planta através da penetração ativa do microrganismo, a sintetizar compostos bioativos que atuem sobre os fitopatógenos ou alterem funções morfofisiológicas, como por exemplo síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada de patógenos na planta hospedeira.

O trabalho de Sundaramoorthy et al. (2012) ilustra bem o caso acima, onde a aplicação das cepas endofíticas de rizobactérias, isoladamente e/ou em combinação, em experimentos realizados em casa de vegetação, foram eficazes no controle da murcha de *Fusarium chilli* através da IRS. A presença dos microrganismos induziu o aumento da atividade das β -1,3-glucanases, quitinases e ácidos fenólicos envolvido na síntese de fitoalexinas, promovendo assim o crescimento de plantas.

O efeito da bactéria endofítica *Pseudomonas putida* MGY2, na redução da antracnose causada por infecção *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão foi evidenciada através do aumento significativo da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), catalase (CAT) e peroxidase (POD), além dos altos índices de ácidos fenólicos, sugerindo que o mamão é capaz de responder ao endófito *P. putida* MGY2, ativando enzimas e genes de defesa e, assim, apresentarem maior resistência aos patógenos (Shi et al., 2011). Outra ação das bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* é a produção de antibióticos. Um destes compostos, os peptídeos antifúngicos conhecidos como pseudomicinas, têm sido considerados

para uso na agricultura para controle do fungo fitopatogênico *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da doença sigatoka negra em bananas (Strobel et al., 2004).

2.4. Estresses ambientais

O estresse tem elementos construtivos e destrutivos à planta, e é um fator de seleção e uma força motriz ao incremento da tolerância e evolução adaptativa da espécie. Em condições de estresse a planta pode tanto ativar respostas metabólicas secundárias, aumentando sua atividade fisiológica, como suprimir determinadas funções fisiológicas que induzam alterações no comportamento vegetal, cuja irreversibilidade vai depender do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta (Pimentel, 1995).

A ocorrência de déficit hídrico em plantas cultivadas afeta o crescimento e o desenvolvimento das culturas em todo o mundo. Desde os antigos povos sumérios, o homem tem procurado uma alternativa mais efetiva do aproveitamento da água para superar os efeitos do déficit hídrico às plantas (Santos & Carlesso, 1998).

A resposta mais proeminente das plantas ao déficit hídrico consiste no decréscimo da produção da área foliar, do fechamento dos estômatos, da aceleração da senescência e da abscisão das folhas. Quando as plantas são expostas a situações de déficit hídrico exibem, freqüentemente, respostas fisiológicas que resultam de modo indireto, na conservação da água no solo, como se estivessem economizando para períodos posteriores (McRee & Fernández, 1998).

Chenu & Roberson (1996) verificaram em seus experimentos que a alta produção de exopolissacarídeos (EPS) sob baixo potencial hídrico possibilitou a sobrevivência de bactérias submetidas a esse estresse por aumentar a retenção de água e regular a difusão das fontes de carbono orgânico.

Choudhary et al. (2011) afirmam que para compreender os mecanismos que regulam a mitigação de estresses ambientais nas plantas por rizobactérias é necessário saber as interações entre planta-bactérias, microbiota da rizosfera e a relação dos fatores abióticos e bióticos sobre essas comunidades. Segundo os mesmos autores, as bactérias do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes e *Bacillus* sp. podem mitigar o estresse biótico pela supressão dos

microrganismos competidores, provavelmente fitopatógenos, através da produção de antibióticos.

Segundo Chen et al. (2006) algumas rizobactérias, tais como *Bacillus* sp. têm inibido a ação de patógenos por meio da produção de lipoproteínas, surfactantes (saponinas) e bacilomicinas D oriundos de metabolismo secundário, que atuam na destruição da membrana plasmática dos fitopatógenos.

No estudo desenvolvido por Khan et al. (2013) com a plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) e o fungo endofítico *Penicillium resedanum*, revelaram que as plantas endófito-inoculadas apresentaram um aumento na síntese de flavonóides (daidzin, daidzeína e m-glicitina) protegendo a planta contra os danos causados pela radiação UV, reduzindo os impactos negativos do estresse térmico, quando comparadas ao controle.

Egamberdieva et al. (2008), em seu estudo com plantas de trigo *in vitro*, testaram oito isolados de bactérias que promoveram a proteção das plantas quando submetidas à estresse salino. Dentre os mecanismos de promoção observados por ele, destacam-se a produção de compostos voláteis pelas bactérias, enzimas lípases e proteinases que induziram o aumento da produção de terpenóides pela planta, substâncias estas, que comumente atuam como anti-herbivoria.

A atividade da enzima ACC-deaminase pode ser útil na manutenção do crescimento e desenvolvimento das plantas em condições de estresse, reduzindo o estresse induzido pela produção de etileno. Ultimamente, têm sido feitos testes para introduzir genes ACC deaminase em plantas, afim de regular os níveis de etileno nesses vegetais obtendo um melhor crescimento, especialmente sob condições de estresse (Muhammadb et al., 2007).

O gene responsável pela codificação da enzima ACC-deaminase é o *acdS*. As bactérias que contêm esse gene são capazes de reduzir os níveis de etileno produzidos pela planta, através da utilização da molécula ACC deaminase, produzida pela planta durante a rota de sinalização do etileno, como fonte de nitrogênio. Sendo assim, estas bactérias conseguem ativar a promoção de crescimento na planta, pelo hormônio AIA e/ou atenuar algum estresse pelo qual a planta esteja passando, pela interrupção da via do etileno (Glick, 2005).

No trabalho desenvolvido por Yim et al. (2013) com bactérias promotoras de crescimento da espécie *Methylobacterium* sp. no controle da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) do tomateiro, foi observado uma redução nos níveis de etileno mediado pela atividade da enzima ACC-deaminase. Segundo o autor, plantas inoculadas com *R.*

solanacearum e tratadas com *Methylobacterium* sp. apresentaram redução significativa dos sintomas da doença, baixa emissão de etileno em condições de casa-de-vegetação, além de apresentarem aumento na produção de proteínas relacionadas a indução de resistência sistêmica. Esses resultados revelam o potencial da bactéria *Methylobacterium* sp. no aumento das enzimas de defesa por modulação da biossíntese do etileno, sugerindo o uso desses microrganismos como potenciais agentes de biocontrole do cultivo do tomateiro.

Barnawal et al. (2012) relatam que são muitos os efeitos do estresse na planta, em condições de alagamento. Sob essas condições a planta pode apresentar aumento dos níveis endógenos de etileno, redução da concentração da clorofila, maior peróxidação lipídica, concentração de prolina e redução na absorção dos nutrientes foliares. No trabalho desenvolvido por esses autores, foi investigada a ação de quatro isolados de rizobactérias (*Achromobacter xylosoxidans*, *Serratia ureilytica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Ochrobactrum rhizosphaerae*) na promoção do crescimento da planta *Ocimum sanctum* (sequeiro) em condições de alagamento em casa-de-vegetação. A atividade da enzima ACC-deaminase produzida por essas rizobactérias foi testada em condições normais e de alagamento, demonstrando que as plantas apresentaram tolerância máxima, registrando um crescimento de 46,5% maior do que as plantas não inoculadas em condições de alagamento, além da redução nos níveis de etileno endógeno (Barnawal et al., 2012).

Os resultados obtidos nos experimentos de Siddikee et al. (2011) elucidam os efeitos da enzima ACC-deaminase na promoção do crescimento da espécie *Capsicum annuum* L. (pimenta) submetida a estresse salino. No trabalho desenvolvido pelos autores, a utilização de bactérias halotolerantes produtoras de ACC-deaminase mitigaram os efeitos do estresse salino através da redução dos níveis do etileno, além de aumentarem a absorção de nutrientes pela planta.

Jalili et al. (2009) utilizaram as espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, estirpes sintetizadoras da enzima ACC-deaminase, com intuito de minimizar os efeitos do estresse salino sobre a espécie *Brassica napus* L. (canola) e observaram na germinação, um aumento significativo do crescimento das sementes de canola, verificando que essas estirpes caracterizam uma promissora ferramenta biotecnológica no que se refere à proteção da planta contra o estresse salino.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado em todos os ensaios experimentais foram sementes de tomate cultivar Santa Clara Miss Brasil (*Solanum lycopersicum L.*). Os experimentos foram realizados nos municípios de Valença e Vassouras, estado do Rio de Janeiro. A avaliação do efeito da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. na promoção do crescimento do tomateiro foi feita através da elaboração de bioensaios laboratoriais.

3.1. ADAPTAÇÃO DE CÂMARA DE CRESCIMENTO

O modelo experimental desenvolvido *in vitro* neste trabalho baseou-se em ensaios laboratoriais prévios com sementes de tomates no ano de 2011 e 2012.

A avaliação do crescimento de plântulas de tomate em diferentes condições de tratamento foi realizada sob a bancada do laboratório da Universidade Severino Sombra (USS- Vassouras/RJ) (Figura 4).

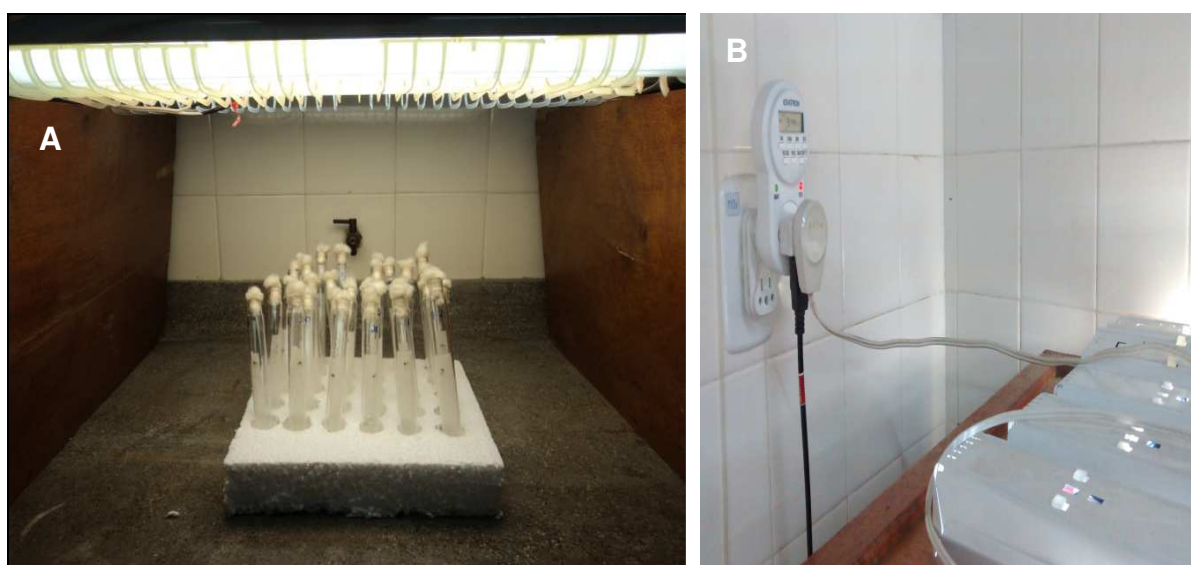


Figura 4: Sistema de iluminação instalado sob a bancada do Laboratório de Botânica da USS/Vassouras (A) controlado por um Timer Digital da Marca Exatron (B).

Na bancada foi instalado um sistema similar a uma BOD, constituído de 4 conjuntos de lâmpadas fluorescentes com aproximadamente 50 micromol m⁻² s⁻¹ de fótons, ligadas a um timer estabelecendo um fotoperíodo de 12 horas, apoiadas sobre dois suportes de madeira de aproximadamente 40 cm de comprimento.

Durante os meses de execução do bioensaio em 2012, a temperatura máxima, média e mínima foi aferida com termômetro de máxima e mínima, registrados e plotados conforme os dados descritos na figura 5, sendo que o valor mais elevado de temperatura registrado durante o período experimental foi de 31 °C, e a média das temperaturas máximas foram 26 °C. O menor valor de temperatura mínima foi registrado em 23 °C, sendo a média das temperaturas mínimas de 24 °C, enquanto que os valores de temperatura média variaram entre 23,5 e 28,5 °C, com média de 25°C.

O mesmo procedimento foi repetido ao longo dos anos (2013, 2014 e 2015) de experimentação, e a análise da variação da temperatura possibilitou observar que os valores se mantiveram constante com 25 °C a média, 26 °C a máxima e 24 °C a mínima, apresentando variações de 1 °C para mais ou para menos de acordo com os dias mais quentes e mais frios.

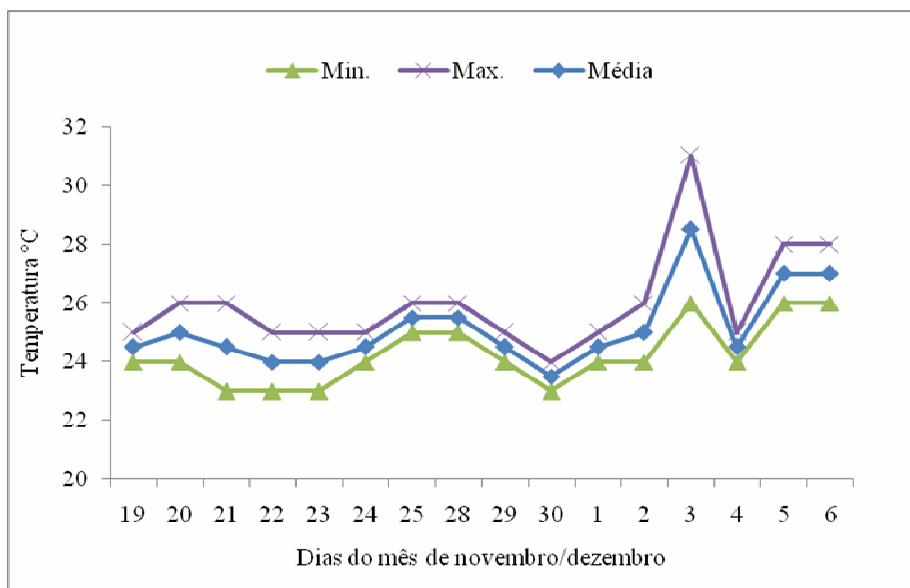


Figura 5: Valores de temperatura máxima, mínima e média registrados durante o período experimental, equivalentes aos dias 19 de novembro até 06 de dezembro, em Vassouras-RJ.

A bactéria endofítica utilizada no presente trabalho foi isolada a partir de sementes de tomate extraídas de frutos produzidos no setor de Horticultura da UFRRJ no ano de 2008 e recebeu o número de registro ENA 4593. Esse microrganismo foi escolhido, por ter se apresentado promissor em ensaios anteriores em condições de laboratório ao longo dos testes de adequação do estresse osmótico utilizando diferentes concentrações de PEG₆₀₀₀ realizados em 2011.

A fim de avançar nos estudos dos efeitos de BEs sobre a promoção de crescimento de plantas de tomate e mitigação a seca em condições de laboratório foi realizada a caracterização fenotípica e molecular da estirpe ENA 4593, sendo esta estirpe identificada como *Serratia* sp.

3.2. EFEITO DA INOCULAÇÃO COM ESTIRPE ENA 4593 E DO TRATAMENTO COM PEG₆₀₀₀ EM SEMENTES DE TOMATE CV. SANTA CLARA (Experimentos I e II)

3.2.1. Preparo do inóculo

Para estudar o efeito da promoção de crescimento da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. em plântulas de tomate, primeiro foi feito o ajuste da concentração de inóculo, visando padronizar a suspensão aplicada sobre as sementes. A suspensão foi ajustada para uma concentração de inóculo equivalente a 10^8 UFC/mL. Esse ajuste foi feito com base nos valores de transmitância obtidos por meio de uma curva de diluição usando para isso diferentes valores de transmitância para um mesmo isolado. A partir desses valores realizaram-se diluições seriadas para obtenção das unidades formadoras de colônias (UFC) referentes a cada valor de transmitância. Os valores de transmitância e o número de UFC foram passados para planilha Excel onde foi construída uma curva e obtido uma equação onde X = valor da transmitância e Y = UFC (Tabela 1).

Tabela 1. Equação obtida a partir da curva de calibração e os respectivos valores do coeficiente de Regressão R^2 . Valores da transmitância calculada para obtenção de uma suspensão ajustada para 10^8 UFC ^{-1ml}.

| Identificação do Isolado | Equação | Valor de R^2 | Transmitância calculada (%) |
|----------------------------------|-----------------------|----------------|-----------------------------|
| Testemunha | - | - | 100 |
| <i>Serratia</i> sp. (isolado 11) | $y = -5E+07x + 5E+09$ | 0,9978 | 76,3 |
| <i>Serratia</i> sp. (isolado 15) | $y = -1E+08x + 1E+10$ | 0,8927 | 76,8 |
| <i>Serratia</i> sp. (isolado 21) | $y = -9E+09x + 8E+11$ | 0,9067 | 86,8 |

X= valor da transmitância e Y= UFC

A suspensão concentrada do isolado foi preparada com um volume de aproximadamente 10 mL. A transmitância dessa suspensão foi aferida em aparelho espectrofotômetro e em seguida anotada o seu valor. Uma alíquota de 100 μ L da suspensão

foi retirada e adicionada a um microtubo de 1,5 ml contendo 900 µL de solução salina (diluição 10^{-1} da transmitância). O microtubo foi reservado. Para obtenção do segundo valor de transmitância foi adicionado cerca de 6 mL de solução salina ao tubo contendo a suspensão inicial. Novamente foi aferida a transmitância e anotado o seu valor. Esse procedimento foi realizado até a obtenção de pelo menos 5 valores de transmitância. Após a obtenção das transmitâncias, procedeu-se a diluição seriada até 10^{-7} . Três alíquotas de 100 µL foram retiradas de cada diluição e riscadas em três placas. As placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica com temperatura regulada para 28° C por 48 horas. As UFC foram anotadas por placas, retiraram-se o valor médio de UFC/ placa e após procedeu-se o cálculo para obtenção de UFC.mL⁻¹.

3.2.2. Desinfestação das sementes

Antes de serem submetidas aos tratamentos, as sementes cv. Santa Clara foram superficialmente desinfestadas com uma solução de álcool a 50% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 0,7% por 3 minutos e sucessivas lavagens de água destilada estéril em agitador vórtex, com cinco trocas de água. Após a desinfestação, as sementes foram peneiradas e colocadas para secar em temperatura ambiente.

3.2.3. Tratamento das sementes

A. Inoculação à vácuo

Para avaliar os efeitos da inoculação da bactéria endofítica na fase de germinação do tomateiro, foram realizados experimentos utilizando o isolado ENA 4593 de *Serratia* sp., obtido da coleção do Laboratório de Patologia e Epidemiologia de Sementes da UFRRJ, Seropédica/RJ.

A manutenção do isolado em condições laboratoriais, foi possível através da utilização de 6 mL de meio de cultura Nutriente Agar (Fahy e Hayward, 1983), disposto de forma inclinada em tubos de ensaio de 15 cm de comprimento. Sobre a superfície sólida do meio de cultura (NA) foi repicada uma alíquota de aproximadamente 0,1 mL do isolado, com auxílio de uma alça bacteriana. Além disso, foi utilizado glicerol estéril a 20 % nos tubos de ensaio contendo o isolado bacteriano repicado, a fim de recobrir toda a superfície do meio de cultura para posteriormente serem acondicionados na geladeira.

A determinação da concentração de células bacterianas presentes na suspensão foi feita através da utilização de uma alíquota de suspensão bacteriana, na sua fase de crescimento exponencial, diluída em água destilada estéril e calibradas em espectrofotômetro. Para a calibração e leitura da amostra foi utilizado o comprimento de onda de 540 nm, e a concentração padrão obtida na curva de inóculo, de modo que a concentração final fosse de 10^8 UFC.ml⁻¹ (80% de transmitância) presente na solução.

As sementes previamente desinfestadas foram depositadas em frascos Erlenmeyers estéreis, submetidos a dois tipos de tratamentos. Metade das sementes desinfestadas foram colocadas nos frascos de Erlenmeyer contendo 40 mL de água destilada estéril (sem inóculo) e a outra metade foi depositada em solução de 40 mL de suspensão bacteriana do isolado na concentração de 10^8 UFC.ml⁻¹ (com inóculo).

Os frascos foram acondicionados a um dessecador acoplado à bomba de vácuo, sendo que o vácuo aplicado foi equivalente a 680 mm de Hg, com liberação lenta do ar, em três ciclos sucessivos, com duração de cinco minutos cada ciclo, intercalados com três minutos de repouso (Figura 6).



Figura 6: Inoculação da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. em sementes de tomateiro cv. Santa Clara, com auxílio de um dessecador acoplado à bomba a vácuo no laboratório de Botânica da USS/Vassouras-RJ.

Após a inoculação, as sementes foram peneiradas e colocadas para secar sob ventilação forçada em Câmara de Fluxo Laminar por uma hora.

A viabilidade do inóculo foi observada a partir da deposição de sementes inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura NA. Em seguida, os tubos foram acondicionados em estufa bacteriológica regulada para temperatura de 35-37 °C por 48 horas. A colonização do inóculo nas sementes foi comprovada com o crescimento de colônias bacterianas, sobre a superfície do meio de cultura (Figura 7).



Figura 7: Sementes de tomate cv. Santa Clara Miss Brasil colonizadas pela estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp.

B. Tratamento com diferentes concentrações de PEG₆₀₀₀

i. Experimento I: 6%, 7% e 8% de PEG₆₀₀₀

A avaliação do efeito do estresse coloidal sob as sementes do tomateiro foi imposto através da utilização da molécula de polietileno glicol 6000 (Marca ISO FAR, código 776) (Shtereva et al., 2008).

A utilização desses polímeros em ensaios laboratoriais como agente osmótico é muito comum por ser um composto quimicamente inerte e não tóxico (Xing e Wu, 2012). Essa restrição hídrica ocorre porque a molécula de PEG diminui a capacidade de movimentação da água, ou por induzir a diminuição do potencial osmótico (estresse osmótico) ou por aumentar as concentrações de solutos no meio exógeno (estresse coloidal).

Para o ensaio dose-resposta em plântulas de tomateiro foram preparadas soluções de PEG₆₀₀₀ em diferentes concentrações. No primeiro experimento foram utilizadas as dosagens 6%, 7% e 8% de PEG₆₀₀₀.

As sementes de tomate germinadas em câmara de crescimento dentro de caixas Gerbox, contendo 8 mL de água destilada estéril, foram pré-selecionadas a partir da protrusão da raiz, até que estas tivessem atingido um comprimento de 8 mm a 12 mm de comprimento, de acordo com o padrão do paquímetro digital (Mitutoyo-Digimatic Caliper).

As sementes pré-selecionadas foram transferidas para tubos de ensaio estéreis de 15 cm de comprimento estéreis, contendo 2 mL de água destilada estéril mais uma tira de papel germitest 10 x 1,5 cm embebido com as soluções água destilada estéril (testemunha), solução de PEG a 6%, 7% e 8% (tratamentos) (Figura 8). Os tubos foram fechados com algodão hidrófilo, para melhor facilitar as trocas gasosas.



Figura 8: Papel germitest embebido em solução de PEG₆₀₀₀ (A) e introdução do papel dentro dos tubos de ensaio (B).

Os tubos contendo as sementes de acordo com os respectivos tratamentos foram colocados, num suporte de isopor e, em seguida transferidas para o sistema de iluminação, permanecendo ali por dois dias. Após esse período, as sementes contendo as radículas foram retiradas dos tubos e em seguida aferidos os comprimentos da raiz e o crescimento da parte aérea da planta.

O efeito do PEG₆₀₀₀ sobre as plântulas de tomateiro foi determinado através do crescimento radicular líquido (CR_l).

ii. Experimento II: 7% e 21% de PEG₆₀₀₀

Para a simulação do estresse osmótico foram utilizadas as concentrações de 0%, 7% e 21% de PEG₆₀₀₀, correspondentes aos potenciais hídricos de 0,0 MPa, -0,08MPa e -0,54MPa, respectivamente.

As sementes de tomate germinadas em caixas Gerbox, contendo 8 mL de água destilada estéril, foram pré-selecionadas a partir da emissão da radícula que atingisse o comprimento entre 8 e 12 mm. Após a pré-seleção, as sementes de tomateiro foram transferidas para tubos de ensaio estéreis de 15 cm de comprimento estéreis, contendo 2 mL de água destilada estéril mais uma tira de papel germitest 10 x 1,5 cm embebido com as seguintes soluções: água destilada estéril (testemunha), solução de PEG 7% e 21% (Figura 8).

Os tubos foram fechados com algodão hidrófilo, e transferidos para a câmara de crescimento com os respectivos tratamentos, permanecendo durante o período de experimentação. Após esse período, as sementes contendo as radículas foram retiradas dos tubos e em seguida aferidos os comprimentos da raiz e o crescimento da parte aérea da planta.

As variáveis aferidas acima serviram como base para calcular o crescimento radicular líquido (CR_l) e verificar o efeito do PEG sobre o tomate.

3.2.4. Germinação das sementes

As sementes de tomate foram colocadas para germinar em câmara de crescimento adaptada, dentro de caixas Gerbox que foram previamente lavadas e esterilizadas em Câmara de Fluxo Laminar UV por 30 minutos. Dentro da caixa Gerbox foram colocados papel germitest também esterilizados. Além do papel germitest foram acrescentados as caixas Gerbox o equivalente a 8 mL de água destilada estéril, a fim de manter a umidade durante o período de experimentação.

As sementes foram dispostas de forma que o eixo embrionário (epicótilo) ficasse voltado para a posição inferior da caixa de modo que no momento em que a radícula emergisse, seu crescimento inicial se desse verticalmente, além disso, as caixas gerbox foram dispostas formando um ângulo de 45° (Figura 9).

A manutenção das sementes em câmara de crescimento ocorreu até que estas começassem a emitir a protusão da raiz, que ocorria por volta de quatro dias após o início do processo de germinação. Sendo que para seleção das sementes foi adotado um critério padrão

de comprimento da raiz axial entre 8 a 12 mm de comprimento. Após pré-seleção, as sementes eram submetidas aos diferentes tipos de tratamentos.

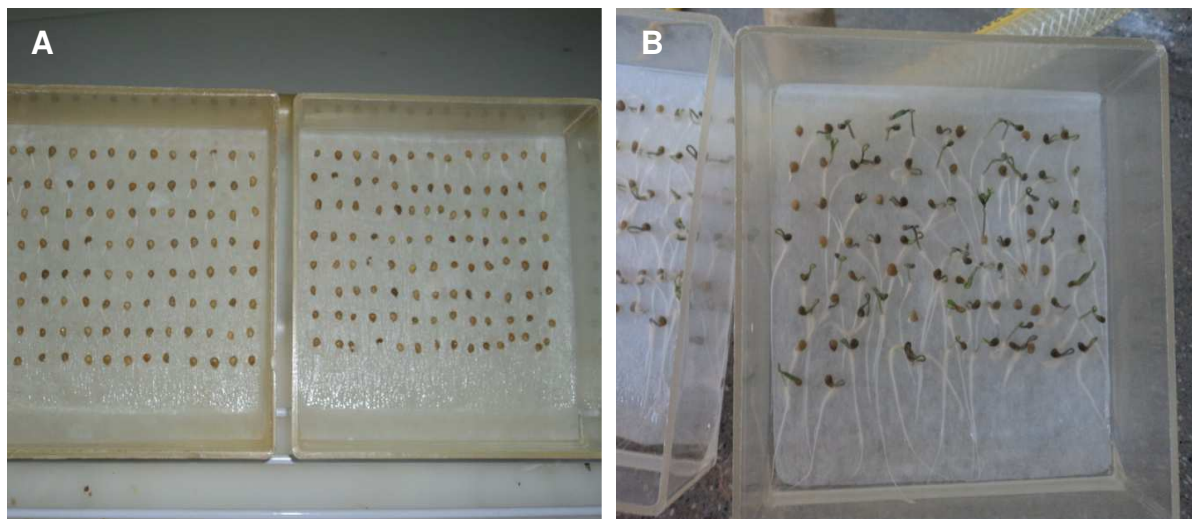


Figura 9: Germinação das sementes de tomate Cv. Santa Clara em caixa Gerbox (A e B), Laboratório de Botânica – USS/Vassouras.

3.2.5. Cultivo de sementes germinadas *in vitro* em câmara de crescimento

O cultivo de sementes de tomate germinadas *in vitro* foi realizado na câmara de crescimento desenvolvido no presente trabalho. Sob a bancada do laboratório foi adaptada a câmara de crescimento, que possibilitou avaliar o crescimento de plântulas de tomate em diferentes condições de tratamento durante todo o período experimental (figura 4).

Durante os ensaios laboratoriais, as condições de luminosidade, fotoperíodo e temperatura foram monitoradas de acordo com as informações descritas no item 3.1.

As sementes desinfestadas foram colocadas para germinar conforme item 3.2.4 e mantidas em câmara de crescimento (fotoperíodo de 12 horas; 25 °C). Após a emissão da raiz, foi mensurado o comprimento radicular (8-12 mm) com auxílio de um paquímetro, e em seguida, pré-selecionadas para a realização dos bioensaios.

As sementes sem inóculo (controle) e com inóculo foram transferidas para tubos de ensaio estéreis contendo papel germitest e 2 mL de água destilada estéril a fim de manter a umidade necessária ao período de germinação. Os tratamentos com sementes sem inóculo (controle), com inóculo (bacterizada) e diferentes concentrações de PEG foram mantidos por dois dias nesse sistema, onde posteriormente eram feitas as coletas de dados e analisadas as

variáveis; comprimento líquido radicular (mm), comprimento do hipocótilo (mm), comprimento cotiledonar (mm) e número de raízes laterais.

O design experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 8 repetições para cada tratamento.

3.2.6. Parâmetros avaliados

Para este bioensaio, foram consideradas as alterações morfológicas e fisiológicas do tomate durante a fase de germinação.

Após o período de seis dias do início do experimento, as plântulas submetidas ao estresse a bacterização e o controle, foram retirados cuidadosamente dos tubos para serem mensurados o comprimento líquido radicular (mm), comprimento do hipocótilo (mm), comprimento cotiledonar (mm) e número de raízes laterais (Figura 10). As medições foram feitas com auxílio de um paquímetro digital da Marca Mitutoyo-Digimatic Caliper.

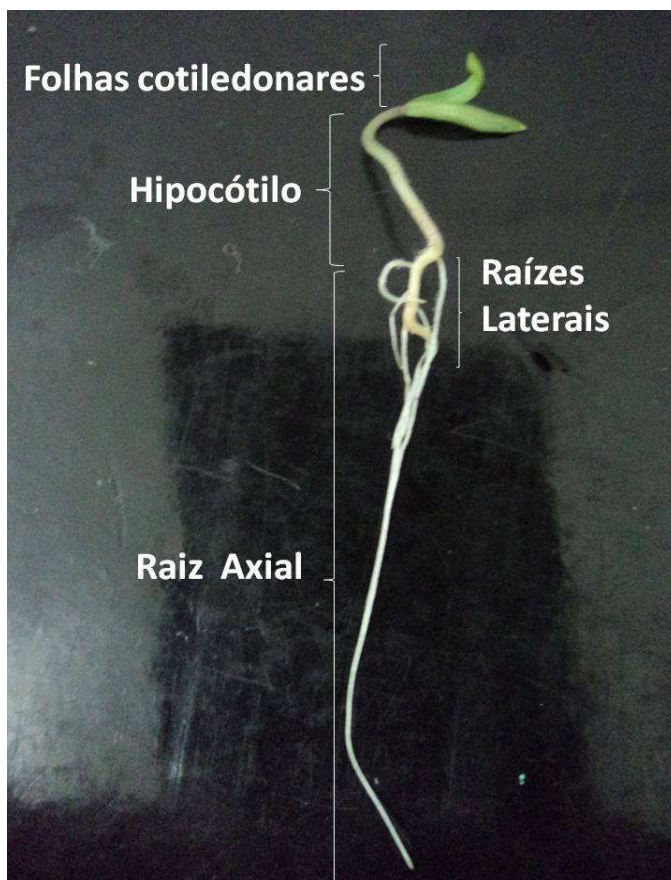


Figura 10: Morfologia de plântulas de tomateiro Cv. Santa Clara, após 6º dia do início do experimento *in vitro*. Representação das variáveis analisadas durante a execução do bioensaio.

A análise das variáveis deu-se através das equações abaixo descritas:

(A) Comprimento líquido radicular:

$$CR_l = \text{comprimento final (C.F)} - \text{comprimento inicial (C.I)}$$

(B) Comprimento do hypocótilo:

$$CH = \text{comprimento final hypocótilo(Cf)} - \text{comprimento inicial hypocótilo(Ci)}$$

(C) Comprimento cotiledonar:

$$CT = \text{comprimento máx. da largura da 1}^\circ \text{ folha} + \text{comprimento máx. da largura da 2}^\circ \text{ folha}$$

3.2.7. Análise estatística

Inicialmente foi feita a estatística descritiva de todos os dados obtidos a partir dos ensaios experimentais.

Os resultados foram interpretados estatisticamente e submetidos à análise de variância (ANOVA) dos dados à significância de 5% e 1% de probabilidade pelo teste F com o auxílio do Programa Microsoft Excel e SAS. A comparação das diferenças entre as médias foi realizada através do teste de média “least significant difference” (LSD) ao nível de 5% de significância.

3.3. AVALIAÇÃO DO FITORMÔNIO ÁCIDO INDOL-ACÉTICO (AIA) NO CRESCIMENTO DO TOMATEIRO (EXPERIMENTO III)

3.3.1. Determinação de AIA e compostos indólicos produzidos pela ENA 4593

A determinação de AIA e compostos indólicos produzidos pelo isolado ENA 4593 de *Serratia* sp., foi realizado na EMBRAPA - Agrobiologia- Seropédica/RJ, em colaboração com o Prof. Dr. José Ivo Baldani.

A análise da quantificação de auxinas produzidas pelo isolado ENA 4593, foi realizado através da técnica de colorimetria. Essa técnica foi proposta por Rodrigues et al. (2007), que utilizou para tal análise, os meios de cultura LGI-P modificado, Dygs e C2, além de soluções de triptofano, AIA sintético e o reagente de Salkowski (Gordon & Weber, 1951).

Para a construção da curva de calibração de AIA foram utilizadas concentrações crescentes de 0 a 1000 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de AIA, segundo o método descrito por Sarwar & Kremer (1995). Alíquotas de 150 μL de cada diluição foram transferidas para microplacas de poliestireno, e posteriormente acondicionadas 100 μL do reagente Salkowski. Após o período de 30 minutos em reação no escuro a temperatura ambiente, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Os dados obtidos foram processados no programa Ascent Software for iEMS Reader MF e plotados na forma de gráfico de dispersão.

O isolado ENA 4593 de *Serratia* sp. foi cultivado em microplacas contendo meio LGI-P modificado, estando este submetido a presença e a ausência de triptofano durante o seu período de cultivo, caracterizando dois experimentos distintos. Após a inoculação no meio líquido LGI-P com e sem L-triptofano, as microplacas foram incubadas a 30 °C sob agitação, até completar 4 dias. Já, no segundo experimento o isolado foi avaliado mediante a presença de L-triptofano em células de colônia (meio sólido LGI-P) e cultura líquida (células lavadas e ajustadas a Densidade Ótica – $\text{DO}_{620\text{nm}}$). Após o período de 168 horas, foi avaliado e medido o crescimento bacteriano pela $\text{DO}_{620\text{nm}}$ em microplacas. Em seguida, as culturas foram centrifugas e o sobrenadante extraído para posterior utilização em reações espectrofluorimétricas. A análise da concentração de auxinas foi realizada através da determinação da curva de calibração de AIA.

3.3.2. Preparo do inóculo

O inóculo de ENA 4593 foi obtido através da retirada de uma alíquota de 0,1 mL do cultivo de estoque bacteriano mantido em refrigeração nas condições laboratoriais.

Para o experimento *in vitro* a suspensão bacteriana foi reativada metabolicamente, através de repiques em meio de cultura NA, semeadas em triplicatas e transferidas para estufa bacteriológica para crescimento, durante o período de 24-48 horas. Após o crescimento das colônias bacterianas, a concentração do inóculo foi ajustada para o equivalente a 10^8 UFC/mL, conforme descrito no item 3.2.1.

3.3.3. Desinfestação das sementes

A desinfestação das sementes consistiu em eliminar superficialmente qualquer microrganismo através da imersão em uma solução de álcool a 50% por 30 segundos,

hipoclorito de sódio a 0,7% por 3 minutos e sucessivas lavagens de água destilada estéril em agitador vórtex, com cinco trocas de água. Após a desinfestação, as sementes foram peneiradas e colocadas para secar em temperatura ambiente.

3.3.4. Tratamento das sementes

A. Inoculação à vácuo

Para avaliar o efeito do fitormônio AIA no crescimento do tomateiro durante cultivo *in vitro* foram selecionadas sementes de tomate previamente desinfestadas. Após a desinfestação as sementes foram transferidas assepticamente para frascos estéreis de Erlenmeyers contendo 40 mL de água destilada estéril (testemunha) e a outra contendo 40 mL de suspensão bacteriana com concentração final de 10^8 UFC.mL⁻¹ (80% de transmitância) presente na solução, conforme descrito no item 3.2.3.A.

Para inoculação os frascos foram acoplados a um dessecador de bomba à vácuo, submetido a uma pressão de 680 mm Hg, durante três ciclos sucessivos, com duração de cinco minutos, intercalados com três minutos de repouso. Logo após a inoculação, as sementes submetidas aos tratamentos foram peneiradas e colocadas para secar em Câmara de Fluxo Laminar UV, durante uma hora.

A presença do inóculo ENA 4593 foi confirmada através do crescimento de colônias bacterianas sobre a superfície do meio de cultura NA, após o período de 48 horas, de acordo com a figura 7.

B. Tratamento com diferentes concentrações de AIA

Para realização deste ensaio, as sementes de tomate foram colocadas para germinar em câmara de crescimento adaptada (fotoperíodo de 12 horas, 25 °C) até que ocorresse emissão das radículas.

A seleção das sementes baseou-se nos segmentos de aproximadamente 8 a 12 mm de comprimento da raiz axial. Uma vez pré-selecionadas, as sementes eram transferidas para tubos de ensaio estéreis, acrescidos de 2 mL de água destilada estéril, sem lavar o papel germitest, a fim de manter a umidade dos frascos durante o período de execução do experimento.

Para determinar o efeito das doses de AIA sobre o crescimento radicular do tomateiro, foram propostos diferentes tratamentos: Semente sem inóculo e água destilada (controle), semente bacterizada e água destilada e semente sem inóculo com diferentes concentrações de AIA (Figura 11).

O preparo da solução do hormônio vegetal AIA sintético (Marca GoldBio.com) foi feito a partir de 175 mg dissolvidas em 2 gotas de KOH a 0,5 M, até obter-se total dissolução para completar um litro de água, gerando assim a solução 10^{-3} mol L⁻¹. Após este procedimento foram feitas as diluições seriadas em água destilada estéril, até obter as concentrações decimais 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-10} e 10^{-13} mol L⁻¹.

A avaliação das concentrações decimais crescentes de AIA sobre o crescimento de plântulas de tomateiro foi determinada a partir da concentração que melhor promoveria o desenvolvimento das plântulas de tomate.

O bioensaio foi realizado de forma que fosse colocada apenas uma plântula em cada tubo de ensaio, contendo papel germitest embebido com diferentes concentrações decimais de AIA, sendo oito repetições para cada tratamento, dispostos em delineamento inteiramente casualizado.

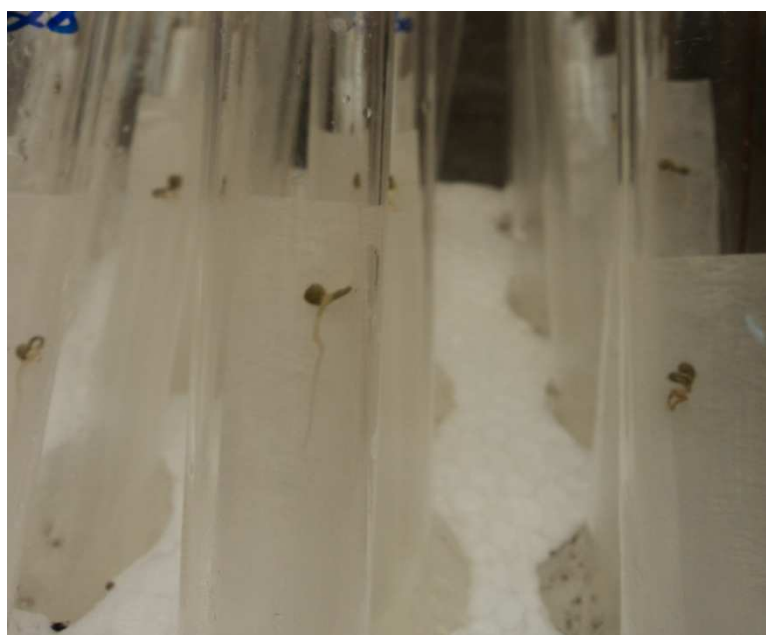


Figura 11: Avaliação do crescimento radicular do tomateiro *in vitro* com os tratamentos; controle, semente bacterizada e semente com diferentes concentrações de AIA.

3.3.5. Germinação das sementes

As sementes de tomate desinfestadas, eram colocadas para germinar em caixas Gerbox previamente esterilizadas, contendo papel germitest. A essas caixas também foram acrescidos

8 mL de água destilada estéril, a fim de manter a umidade necessária a etapa de desenvolvimento do vegetal.

Na câmara de crescimento, a germinação das sementes deu-se de forma de o epicótilo ficasse voltado para posição inferior da caixa, estimulando o crescimento vertical da raiz. Após a protusão da raiz, as sementes eram selecionadas de acordo com o comprimento radicular pré-estabelecido para os ensaios laboratoriais (8-12 mm).

3.3.6. Cultivo de sementes germinadas *in vitro* em câmara de crescimento

Para este ensaio, foram propostas duas etapas distintas de cultivo de sementes *in vitro*, mantido em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, sob iluminação fluorescente.

Na primeira etapa, foi montado um experimento para avaliar o efeito das diferentes dosagens do fitormônio AIA no tomateiro, e a segunda etapa consistiu em verificar o efeito da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. e diferentes concentrações de AIA no tomate. Sendo assim, na primeira etapa o ensaio foi composto por cinco tratamentos: semente de tomate em diferentes concentrações decimais de AIA (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-10} e 10^{-13} mol L⁻¹); semente de tomate e água destilada estéril (testemunha).

A segunda etapa foi montada também em tubos de ensaio contendo diferentes tipos de tratamentos: testemunha (semente e água destilada estéril), *Serratia* sp. (semente inoculada com estirpe ENA 4593 e água destilada) e diferentes dosagens de AIA (semente e as concentrações decimais 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-10} e 10^{-13} mol L⁻¹).

Para as duas etapas distintas foram consideradas oito repetições para cada tratamento dispostos de forma inteiramente casualizada. Ao final de dois dias eram feitas a coleta de dados.

3.3.7. Parâmetros avaliados

As variáveis analisadas ao longo do segmento radicular foram: comprimento líquido radicular (CR_l), comprimento do hipocótilo, comprimento cotiledonar e número de raízes laterais, sendo utilizado para tal, um paquímetro digital.

3.3.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Microsoft Excel para determinar as médias e desvio padrão das amostras.

As diferentes concentrações de AIA foram ajustadas de acordo com a melhor equação para o coeficiente de regressão de 2º grau, testado pelo teste t corrigido com base nos resíduos da análise de variância.

3.4. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE COLOIDAL PROMOVIDO POR ARGILA NO CRESCIMENTO DO TOMATEIRO (EXPERIMENTO IV)

3.4.1. Preparo do inóculo

O preparo do inóculo de ENA 4593 foi obtido de acordo com a metodologia supracitada no item 3.3.1, ou seja, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL do cultivo de estoque bacteriano mantido em refrigeração, para ativação metabólica. Após 48 horas de incubação em estufa bacteriologia, foi possível observar o crescimento bacteriano e conseqüentemente ajustar a concentração para 10^8 UFC/mL⁻¹, conforme descrito na curva de calibração item 3.2.1.

3.4.2. Desinfestação das sementes

A metodologia de desinfestação das sementes está descrita no item 3.2.2, conforme técnica aplicada em todos os bioensaios.

3.4.3. Tratamento das sementes

A. Inoculação à vácuo

A técnica de inoculação à vácuo por mostrar alta eficiência nos processos de bacterização anteriores, foi aplicado em todos os tipos de tratamentos que envolvesse inoculação da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. A referida técnica encontra-se descrita detalhadamente no item 3.2.3.A.

B. Tratamento com 7% de PEG₆₀₀₀

Para avaliação do efeito do estresse osmótico em plântulas de tomate foi selecionada a dose-resposta de 7% de PEG₆₀₀₀. Uma vez preparada a solução de 7% de PEG, as tiras de papel germitest estéreis eram mergulhadas nessa solução e posteriormente transferidas para os tubos de ensaio estéreis de 15 cm de comprimento, contendo 2 mL de água destilada estéril.

Em seguida, as sementes pré-selecionadas de tomate sem inóculo, contendo a emissão da raiz com o comprimento entre 8-12 mm, foram colocados nos tubos de ensaio e transferidos para a câmara de crescimento, permanecendo durante todo período de experimentação.

C. Tratamento com argila

A análise do efeito do estresse coloidal sobre o crescimento radicular do tomateiro foi realizado utilizando para esse fim, partículas de vermiculita autoclavada, cedida pelo laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Para o bioensaio, foi utilizada a argila na forma de suspensão coloidal (m/V), preparada pela dispersão de 1 g de vermiculita para 1000 mL de água destilada estéril e mantidas sob agitação. Uma vez preparada a solução, a mesma era embebida em uma tira de papel germitest estéril e transferida cuidadosamente para um tubo de ensaio, contendo 2 mL de água destilada estéril, garantindo a umidade necessária a manutenção do experimento.

As sementes de tomate sem inóculo, previamente selecionadas com radículas entre 8-12 mm, eram transferidas de forma asséptica para os tubos de ensaio de forma que estas entrassem em contato com as tiras de papel germitest, sendo desta forma imposto o estresse coloidal.

3.4.4. Germinação das sementes

A fase de germinação das sementes ocorreu em câmara de crescimento, de acordo com o procedimento descrito anteriormente no item 3.3.5.

3.4.5. Cultivo de sementes germinadas *in vitro*

Para manutenção *in vitro* das sementes, utilizou-se tubos de ensaio estéreis contendo 2 mL de água destilada estéril e papel germitest embebido com diferentes soluções de acordo com os respectivos tratamentos.

As sementes germinadas com radícula entre 8 e 12 cm de comprimento eram transferidas para os tubos, e os mesmos mantidos em câmara de crescimento, com temperatura e fotoperíodo de 25 °C e 12 horas, respectivamente. Após a transferência dos acessos para os tubos, as sementes foram submetidas a quatro tratamentos: controle (água destilada estéril e semente sem inóculo); PEG 7% (solução de PEG e semente sem inóculo); *Serratia* sp. (água destilada estéril e semente com inóculo) e Argila (solução de vermiculita e semente sem inóculo). Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 7 repetições para cada tratamento.

3.4.6. Parâmetros avaliados

As variáveis aferidas durante a execução desse experimento serviram de base para calcular o crescimento radicular líquido (CR_l) e verificar o efeito dos referidos tratamentos neste bioensaio.

3.4.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) com o auxílio do programa estatístico Microsoft Excel e Sars, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. BIOENSAIOS

4.1.1. Resposta das diferentes concentrações de PEG sobre a plântula de tomateiro X Efeito da bactéria *Serratia* sp.

Ao avaliar o efeito das concentrações crescentes de PEG testadas no bioensaio, observou-se que os valores médios do comprimento radicular líquido de plântulas de tomateiro submetidas à concentração de PEG 7% foi a que mais estimulou o crescimento da raiz atingindo 101,98 mm (CR_l), quando comparada as demais concentrações. Entretanto, ao comparar o efeito da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. com o efeito das concentrações de

PEG testadas, os resultados encontrados revelaram que o estímulo ao crescimento radicular (110,73 mm) promovido pela bactéria *Serratia* sp., não é superado por nenhuma outra concentração de PEG.

A análise de variância (ANOVA) revelou que há diferença significativa no comprimento radicular líquido do tomate ($p < 0.001$) quando submetido à inoculação pela bactéria endofítica *Serratia* sp. (Figura 12). Resultados similares a este também foram encontrados no trabalho desenvolvido por Medeiros (2013), que avaliou o efeito da promoção de crescimento radicular em tomateiro, submetidos ao estresse osmótico imposto por PEG. Segundo a autora, a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* também foi capaz de reduzir os impactos negativos da imposição do estresse imposto por PEG, beneficiando o crescimento da raiz axial.

A análise de variância revelou que o comprimento líquido do hipocótilo (CH) demonstrou variações significativas ($p < 0.003$) quando comparadas aos diferentes tipos de tratamentos.

O número de raízes laterais (RL) também variou ao compararmos o efeito da bactéria e das diferentes concentrações de PEG₆₀₀₀ testadas. O uso do PEG para promover o estresse osmótico induziu um efeito positivo em relação ao aumento do número de raízes laterais (Figura 12).

O padrão observado na indução do número de raízes laterais do tomateiro tanto pelas substâncias húmicas (SH) como pelos ácidos húmicos (AH) no trabalho desenvolvido por Silva et al. (2011), Canellas et al. (2010) e Braz et al. (2010) sugerem uma ação similar a observada pelos hormônios de crescimento especialmente as auxinas, promovendo o aumento do número de raízes laterais emergidas e a proliferação de pêlos radiculares. Esses resultados sugerem que parte do efeito observado, possa estar associada ao aumento dos níveis de auxina produzidos pela planta (Medeiros, 2013; Tyburski & Tretyn, 2004). Pois em situações de estresse, esse fitormônio é capaz de modificar a arquitetura radicular do tomate, induzindo ao aumento do número de raízes laterais.

Baseando-se nos resultados obtidos na avaliação de ensaios prévios com diferentes concentrações de PEG foi proposto um novo bioensaio a fim de comparar os efeitos da bactéria com os efeitos promovidos por PEG 7% e 21% no tomateiro. A escolha da concentração de PEG a 21% baseou-se em ensaios prévios desenvolvidos *in vitro* no trabalho de Gonçalves (2010). De acordo com a autora, a concentração de PEG₆₀₀₀ a 21% é capaz de induz no tomateiro um estresse moderado equivalente a -0,54 MPa, podendo reduzir até 50% do crescimento radicular do tomate.

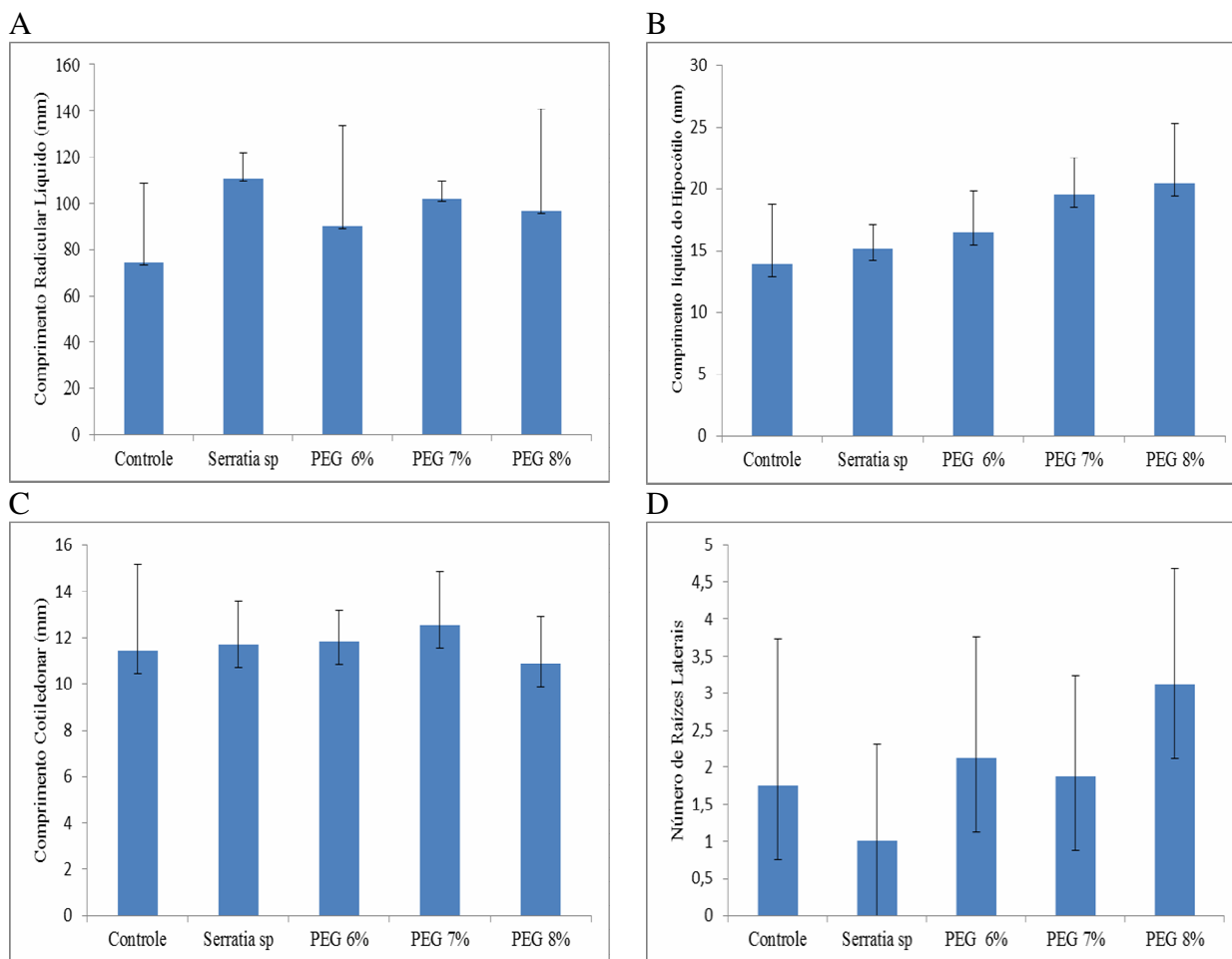


Figura 12: Média e desvio padrão ($X \pm DP$) das variáveis analisadas durante a avaliação do efeito da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. e diferentes concentrações de PEG₆₀₀₀. Comprimento radicular líquido (A), Comprimento líquido do hipocótilo (B), Comprimento cotiledonar (C) e Número de raízes laterais.

O osmocondicionamento promoveu efeito significativo ($p < 0.001$) no crescimento da raiz axial do tomateiro ao ser submetido ao estresse de $-0,08$ MPa (PEG 7%) e a bacterização por *Serratia* sp. (Tabela 2). Já os dados do estresse imposto por $-0,54$ MPa (PEG 21%) revelam diferença não significativa em relação ao controle, mas difere significativamente da concentração de PEG a 7%.

Cardoso et al. (2012) corrobora com os dados encontrados para PEG 21%, quando revela que o efeito do estresse osmótico de $-1,0$ MPa no crescimento da raiz de *Myracrodruon urundeuva* fr. *Allemão* (aroeira-do-sertão) não diferiu significativamente do controle.

O desdobramento da interação também indica que as plântulas de tomate tratadas com estresse osmótico de $-0,08$ MPa não diferiram significativamente das plântulas inoculadas

com *Serratia* sp., sugerindo que o tomateiro tende a crescer mais quando inoculado com a bactéria, promovendo assim a modificação na arquitetura radicular. No trabalho de Medeiros (2013) resultados similares foram observados quando a bactéria *Herbaspirillum* foi capaz de mitigar o estresse imposto por PEG. Segundo a autora, no tratamento inoculado + PEG, o crescimento da raiz axial do tomateiro foi menos reduzido em resposta ao beneficiamento da presença do inóculo.

Silva (2013) ao avaliar o efeito do estresse salino na germinação de semente de três espécies de leguminosas do gênero *Stylosanthes*, verificou que a germinação e a produção de etileno foram inibidos por soluções de NaCl, mas não por soluções isosmóticas de PEG₆₀₀₀. As sementes embebidas com PEG₆₀₀₀, com potencial osmótico de -0,68 MPa, não diferiram significativamente das sementes do controle. Sendo assim, o estresse osmótico não é um disparador da inibição da biossíntese do etileno na germinação de sementes de *S.humilis* tratadas com soluções de NaCl. Consistente com esses dados, sementes inoculadas com soluções de NaCl apresentaram baixos níveis de ACC livre e total comparadas ao controle. Corroborando com os dados observados pelos autores acima citados Pereira et al. (2012) diz que os efeitos do estresse hídrico imposto por PEG no desenvolvimento vegetal pode ocorrer em diferentes estágios, principalmente na germinação.

Com base nos dados, sugere-se que provavelmente o mecanismo associado ao aumento do crescimento da raiz do tomateiro nos tratamentos com PEG 7% seja pelo menos parte do efeito físico e não apenas químico, assim como já foi demonstrado para o efeito dos ácidos húmicos nos trabalhos desenvolvidos por Asli & Neumann (2009) indicando que existe um efeito físico dos ácidos húmicos de reduzir a condutividade hidráulica nas raízes.

Outro fator que corrobora para a explicação de que a promoção de crescimento radicular observada no tomateiro quando tratado com PEG 7% seja em parte um efeito físico é o fato dessa molécula, ser um polímero que restringe a mobilidade da água no vegetal, seja por meio de redução do potencial osmótico, estresse osmótico ou por efeito de estresse coloidal, entupimento dos poros da raiz tal como, os resultados descritos por Asli & Neumann (2009, 2010a) ao utilizar nanopartículas e ácido húmico. Acredita-se ainda, que tal efeito físico possa ser reproduzido pela bactéria *Serratia* sp., quando estas colonizam a raiz e formam o biofilme, uma vez que o biofilme poderia estar hipoteticamente reduzindo a entrada de água na raiz, promovendo um crescimento radicular semelhante ao observado no teste com PEG 7%.

Tabela 2. Médias do comprimento radicular líquido de *Solanum lycopersicum* L. tratadas com concentração de PEG 7%; PEG 21% e isolado ENA 4593 de *Serratia* sp.

| Tratamento | Média (mm) | 5% |
|---------------------|------------|----|
| Controle | 32.583 | B |
| PEG 7% | 69.343 | A |
| PEG 21% | 34.68 | B |
| <i>Serratia</i> sp. | 76.797 | A |

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste LSD.

4.1.2. Avaliação do fitormônio AIA no crescimento do tomateiro X Efeito da bactéria *Serratia* sp.

Os resultados obtidos em relação à habilidade do isolado ENA 4593 de *Serratia* sp. produzir AIA, revelou que esse microrganismo produziu baixos índices de AIA quando comparado aos microrganismos presentes na bacterioteca do Laboratório de Genética e Bioquímica da EMBRAPA-Seropédica. Enquanto a bactéria *Serratia* sp. produziu em média $18,08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AIA, a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* produz $40,27 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AIA (Tabela 3).

Tabela 3. Habilidade da estirpe ENA 4593 de *Serratia* sp. em produzir AIA comparado com outras bactérias da bacterioteca do laboratório de Genética e Bioquímica- Agrobiologia-Seropédica/RJ.

| Estirpe | Concentração de AIA ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) |
|--|--|
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) | 30.28 |
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (ZE78) | 40.27 |
| <i>Azospirillum brasilense</i> (SP7) | 28.01 |
| <i>Serratia</i> sp. (a) | 18.88 |
| <i>Serratia</i> sp. (b) | 17.29 |

Legenda: as repetições estão representadas pelas letras a e b.

Os resultados encontrados por Mascarua-Esparza et al. (1988) corroboram com o presente trabalho ao revelar que a bactéria *Azospirillum lipoferum* produziu baixos índices de AIA ($17,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), quando comparada à outras estirpes do gênero *Azospirillum*.

Dados similares também foram descritos no trabalho de Noori & Saud (2012) que avaliaram a promoção de crescimento através de diferentes mecanismos, dentre eles a produção de AIA, por diferentes estirpes de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Revelando que as estirpes *P. fluorescens* e *P. luteola* foram capazes de sintetizar AIA nas concentrações de 20,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 19,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivamente.

Segundo Sobral (2003) a resposta da planta a AIA produzida por bactérias, tanto pode apresentar efeitos benéficos como depressores. Pois, quando em baixas concentrações pode estimular o crescimento e quando em altas concentrações pode inibir o desenvolvimento da raiz do vegetal.

Estudos relatando as características de bactérias promotoras de crescimento em plantas associadas à capacidade de sintetizar auxinas são muitos; dentre eles podemos citar os trabalhos de Dinesh et al. (2015), Ahemad & Kipret (2014), Kavamura et al. (2013). A síntese da auxina por endófitos são comumente associados aos benefícios advindos da promoção do crescimento da raiz axial. Entretanto, o trabalho desenvolvido por Schlindwein et al. (2008) com o desenvolvimento inicial de plântulas de alface inoculadas com rizobactérias, revelaram que as bactérias que possuíam baixa produção de AIA eram capazes de elevar os parâmetros de germinação e vigor das plântulas. Já as bactérias que produziam altas concentrações de AIA provocaram aumento na formação de plantas anormais e baixo vigor das sementes.

Estes resultados reforçam a hipótese proposta no presente trabalho, uma vez que o mecanismo de promoção de crescimento vegetal imposto por esse endófito, não estaria associado à produção de AIA.

A fim de elucidar o mecanismo de promoção de crescimento exercido pela bactéria *Serratia* sp. no tomateiro foram feitos bioensaios comparando diferentes concentrações de AIA. A avaliação das concentrações decimais crescentes de AIA sobre o crescimento de plântulas de tomateiro foi determinada a partir da concentração que melhor promoveria o desenvolvimento das plântulas de tomate. Os dados descritos na figura 13 foram obtidos através de bioensaios realizados durante o mês de Julho de 2014.

Segundo Lee et al. (2004), o AIA é um dos fitormônios capazes de regular e promover o desenvolvimento dos vegetais por meio de modificações na arquitetura da raiz, interferindo no tamanho e distribuição de raízes, o que implica em uma maior capacidade de absorção de nutrientes minerais.

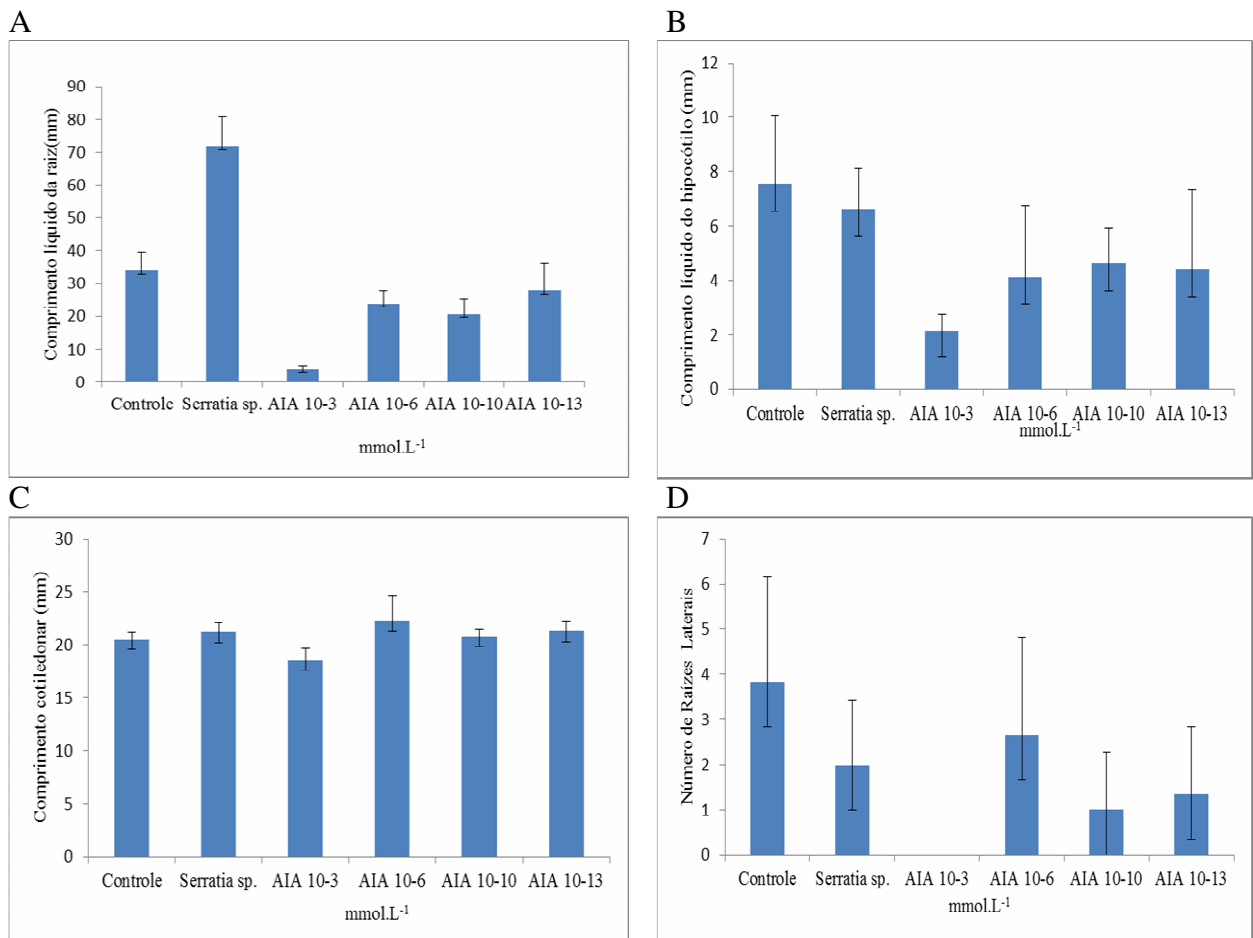


Figura 13: Média e desvio padrão ($X \pm DP$) das variáveis analisadas durante a avaliação do efeito do isolado ENA 4593 de *Serratia* sp. e diferentes concentrações de AIA. Comprimento radicular líquido (A), Comprimento líquido do hipocótilo (B), Comprimento cotiledonar (C) e Número de raízes laterais, realizados durante o mês de Janeiro de 2015.

A análise de regressão do comprimento líquido radicular durante a imposição de diferentes concentrações de AIA mostrou uma tendência linear significativa e um $R^2 = 0.802$, revelando que as maiores concentrações de AIA promoveram um menor crescimento da raiz principal (Figura 14). Esses resultados sugerem que a promoção de crescimento na raiz axial observada no tomateiro não poderia estar associada à auxina. Uma vez que, a maior concentração de AIA (10^{-3}) foi a que mais reduziu o crescimento líquido radicular.

O efeito negativo observado no crescimento da raiz principal reforça a hipótese de que o mecanismo de promoção de crescimento induzido pela bactéria *Serratia* sp. esteja associada em parte ao mesmo efeito físico observado no tratamento com PEG 7%.

O trabalho descrito por Braz et al. (2010) corrobora com os dados encontrados neste trabalho uma vez que ao testar concentrações de auxina e ácidos húmicos na planta

Arabidopsis thaliana, verificou que altas concentrações de AIA induziram uma redução linear no crescimento da raiz principal, quando comparada com as plantas-controle, em contrapartida o efeito dos AH tenderam a induzir o aumento desta variável em todas as concentrações estudadas, com efeito significativo para a concentração de 40 mg L⁻¹. E ainda, segundo os mesmos autores os AH modificaram a morfogênese das raízes da planta, promovendo o aumento da raiz principal, bem como o número de raízes laterais, sugerindo que o mecanismo atuante estejam associado a bioatividade dos AH.

Os resultados encontrados pelos autores supracitados estão em concordância com os resultados também descritos no trabalho de Dobbss et al. (2007) reforçando a hipótese defendida pela tese de que o mecanismo associado à promoção de crescimento da bactéria *Serratia* sp., pode ser explicado por um efeito físico dos AH e do PEG, mas não pode ser reproduzido pela auxina.

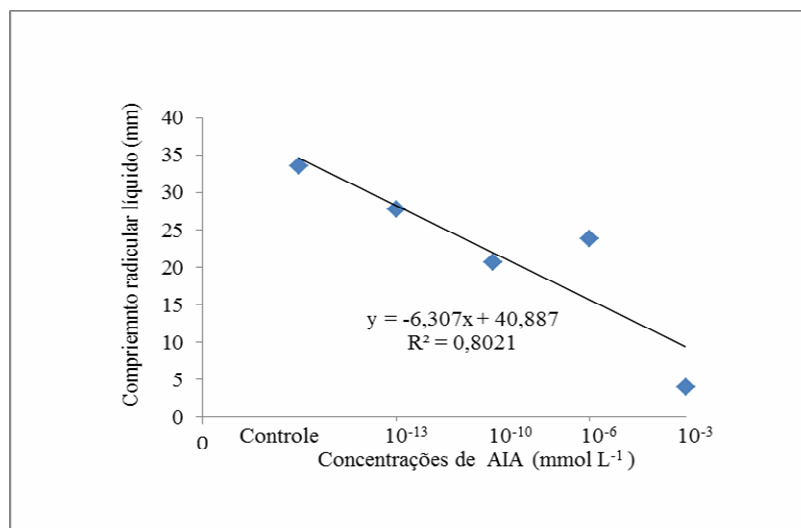


Figura 14: Comprimento radicular líquido de plântulas de tomate submetidas à diferentes concentrações de AIA (mmol L⁻¹).

Os dados encontrados neste trabalho sugerem uma nova discussão ao redor do efeito das auxinas sobre a promoção de crescimento em plantas, mediados por rizobactérias, uma vez que sabidamente na literatura muitos autores, como por exemplo Ahemad & Kibret (2014) destacam os benefícios da promoção de crescimento, através da síntese de fitormônios. Outro fator que corrobora com os resultados encontrados são os baixos índices de AIA produzidos pela bactéria *Serratia* sp., sugerindo que o mecanismo de promoção de crescimento no tomate induzido por este endófito não estaria associado a síntese desse hormônio.

4.1.3. Efeito do estresse coloidal imposto por argila no crescimento do tomateiro

A execução deste experimento *in vitro* teve por objetivo comparar os efeitos da argila (vermiculita), concomitantemente com os efeitos da bactéria *Serratia* sp., do PEG 7% e da auxina.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados revelou que os efeitos da bactéria e do PEG 7% foram os que mais se assemelharam na promoção de crescimento da raiz axial de plântulas de tomate, não diferindo significativamente ($p < 0.05$). Esse resultado indica que pelo menos parte do efeito da promoção do crescimento no tomate induzido pela bactéria (bioatividade) pode ser físico e não apenas químico, como já foi demonstrado para o efeito das substâncias húmicas (SH) descritos nos trabalhos de Asli & Neumann (2009, 2010a, 2010b) (Figura 15).



Figura 15: Crescimento da raiz principal de plântulas de tomateiro após 6 dias do início dos tratamentos com sementes sem inóculo (Testemunha), sementes com PEG₆₀₀₀ (PEG 7%), sementes com inóculo (Bactéria) e sementes com vermiculita (Argila).

O incremento no número de raízes laterais ficou evidenciado no tratamento com argila. Estes resultados estão em concordância com os de Braz et al. (2010) que obteve o

efeito máximo calculado dos AH na formação de raízes laterais quando comparado com efeito de 0,01 mmol L⁻¹ de AIA (Figura 16).

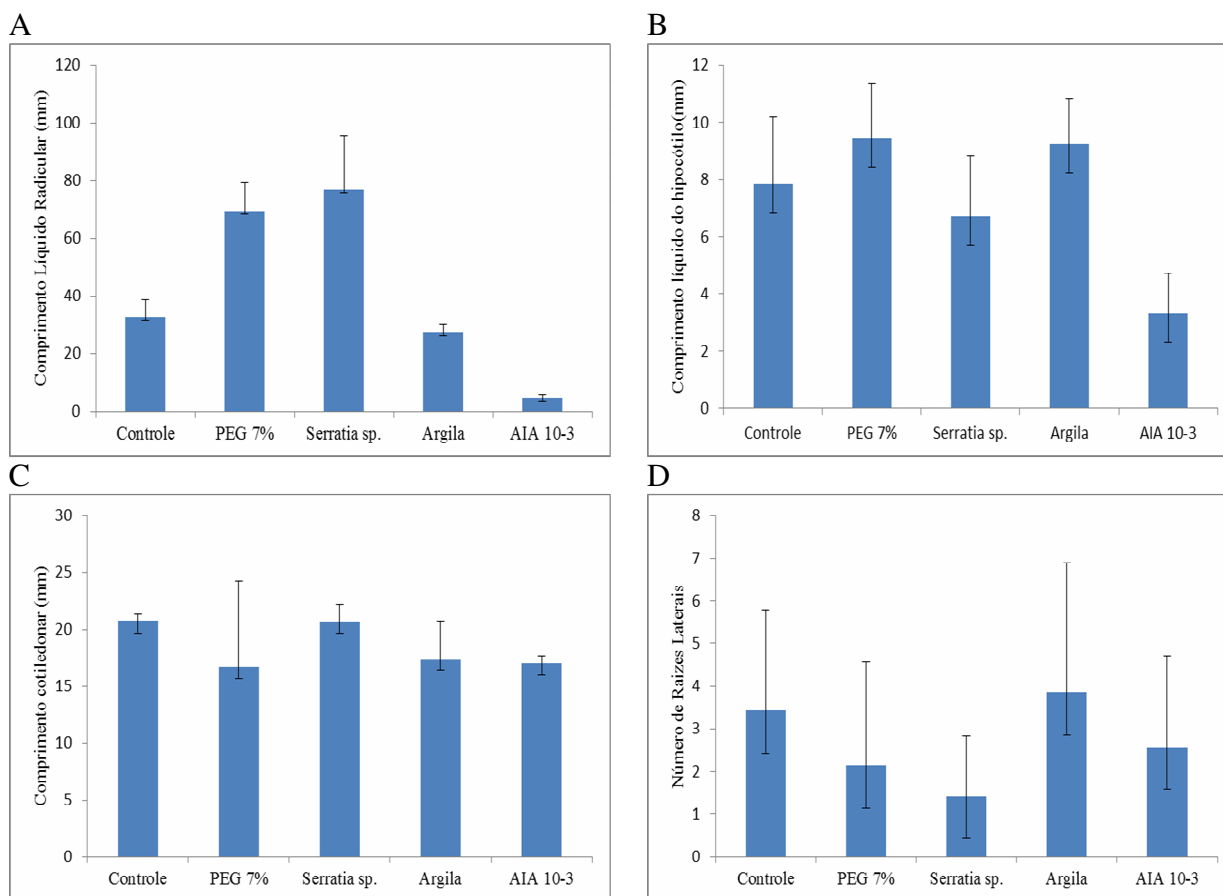


Figura 16: Média e desvio padrão ($X \pm DP$) das variáveis analisadas durante a avaliação da promoção de crescimento em plântulas de *Solanum lycopersicum* submetidas a diferentes tratamentos: Controle, PEG 7%, *Serratia* sp., Argila e AIA 10⁻³ mmol L⁻¹. Comprimento radicular líquido (A), Comprimento líquido do hipocótilo (B), Comprimento cotiledonar (C) e Número de raízes laterais, realizados durante o mês de Julho de 2014.

De acordo com o trabalho dos autores Asli & Neumann (2009, 2010a, 2010b), a resposta da planta às condições de estresse hídrico pode estar associada ao efeito físico-químico dos ácidos húmicos (AH). Os ácidos húmicos são substâncias de natureza orgânica que sabidamente exercem um efeito químico sobre o desenvolvimento do vegetal; como alongamento da raiz, aumento dos pêlos radiculares e n^o de raízes laterais. Segundo Asli & Neumann (2010a), a justificativa para esse efeito estaria associado à redução de condutividade hidráulica da água pela raiz (colóide induzido), onde a presença do ácido húmico na água absorvida pela raiz da planta provocaria uma incrustação na parede celular do vegetal levando a obstrução dos poros e consequentemente, a redução na superfície de contato da raiz com a

água, aumentando a resistência da planta às condições de estresse hídrico através do alongamento radicular.

Em condições de inibição de suprimento de água (estresse hídrico), a planta pode dispor de diversas estratégias para garantir a sua sobrevivência. Segundo Turner (1986) citado por Pimentel (1995), os mecanismos fisiológicos de adaptação à seca podem ser classificados em: **mecanismo de escape**, que pode ser entendido como habilidade da planta em completar o seu ciclo de vida, antes da falta severa de água; **mecanismo de tolerância sob alto conteúdo de água** (termo também conhecido como *avoidance* em inglês) é definido como a capacidade que a planta possui de manter altos índices de hidratação, em baixa condição de precipitação. E por último, o **mecanismo de tolerância sob baixo conteúdo de água** que confere a planta capacidade de se submeter à baixa hidratação, em condições de baixa precipitação.

Ainda segundo Pimentel (1995), inúmeras respostas podem ser consideradas quando o assunto em questão é o estresse hídrico. Isso quer dizer que, a planta pode apresentar concomitantemente os três tipos de mecanismos, apresentando uma resposta aditiva à adaptação do vegetal. Contudo, outros fatores também interferem na compreensão da etiologia das respostas adaptativas do vegetal à seca.

Em contrapartida Lawlor (2013), acredita que a resposta da planta ao estresse hídrico pode ser explicada através da postergação da perda de água pelo vegetal. As modificações na arquitetura da planta, como redução da área foliar, controle da abertura estomatal, entre outros processos morfofisiológicos não estariam exclusivamente associados à genética do vegetal, mas sim as mudanças que este pode sofrer como mecanismo de manutenção de sobrevivência quando submetidos ao estresse. Lawlor (2013) propõe ainda, a introdução de um novo conceito em substituição ao termo resistência de plantas à seca, por um controle tardio da perda de água da planta “*delayed stress onset*”.

Há habilidade das bactérias do gênero *Serratia* colonizarem tecidos internos dos vegetais, bem como estarem presentes na rizosfera, já foi descrita no trabalho de Chen et al. (2010) esta colonização dá-se através da construção de biofilme sobre as raízes e outras partes do vegetal. Segundo Medeiros (2013) no seu estudo desenvolvido sobre os efeitos do estresse hídrico em plântulas de tomate inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* foi observado através de microscopia de fluorescência que essa bactéria foi capaz de colonizar todo eixo radicular, emitindo alto sinal de fluorescência.

No trabalho de Kavamura (2012) linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* foram capazes de crescer em meio com reduzida atividade de água através de alguns mecanismos de

proteção contra a dessecação, como a produção de exopolissacarídeos e biofilme. Além disso, várias linhagens apresentaram mecanismos de redução dos efeitos negativos do estresse causados por etileno.

Dessa forma, estes dados indicam que o biofilme poderia hipoteticamente estar reduzindo a entrada de água na raiz, promovendo o crescimento semelhante ao observado no tratamento com PEG 7%.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho possibilitaram fazer as seguintes conclusões:

- A hipótese de que a resposta ao incremento radicular promovido por *Serratia* sp. em plântulas de tomateiro é semelhante ao promovido pela molécula de PEG em torno de 7% foi aceita, sugerindo que parte do efeito da promoção de crescimento possa ser físico.
- O estímulo a promoção de crescimento radicular em tomate produzido pela bactéria *Serratia* sp. não pode ser reproduzido pela auxina, sugerindo que o mecanismo de promoção de crescimento não esteja associado a esse fitormônio.

Além disso, os resultados encontrados possibilitaram fazer as seguintes considerações finais:

- Não podemos rejeitar ou afastar a hipótese de que a argila pode por efeito físico estimular o crescimento radicular líquido do tomate, pois só usamos uma única concentração. Entretanto, a modificação no incremento do número de raízes laterais ficou evidenciada quando os dados foram comparados com o efeito de altas concentrações de AIA. Deve-se, portanto no futuro testar outras concentrações de argila, a fim de elucidar os mecanismos atuantes no efeito da argila sobre a morfogênese de plântulas de tomateiro.
- O isolado ENA 4593 de *Serratia* sp. modificou a arquitetura do sistema radicular de plântulas de tomate em condições de estresse hídrico, mostrando-se uma alternativa promissora para o desenvolvimento sustentável de uma agricultura limpa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M. & KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26: 1–20, 2014.

ALFONSO, E. T., LEYVA, A., HERNÁNDEZ, A. Microrganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*). *Revista Colomb. Biotecnol.* 2: 47-54, 2005.

ALY, A. H., DEBBAB, A., CLEMENTS, C., EDRADA-EBEL, R., ORLIKOVA, B., DIEDERICH, M., WRAY, V., LIN, W. & PROKSCH, P. NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19: 414-421, 2011.

ARAÚJO, W. L. Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 1996.

ARAÚJO, F. F. & MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). *Summa Phytopathologica*, 35(3): 169-172, 2009

ARSHAD, M., SALEEM, M., HUSSAIN, S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in Biotechnology*, 25: 356-362, 2007.

ASLI, S. & NEUMANN, P. M. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell and Environment* 32: 577–584, 2009.

ASLI, S. & NEUMANN, P. M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant Soil* 336: 313-322, 2010a.

ASLI, S. & NEUMANN, P. M. Accumulation of xylem transported protein at pit membranes

and associated reductions in hydraulic conductance. *Journal of Experimental Botany*, 61 (6): 1711–1717, 2010b.

AZCORN R., BAREA J.M. Synthesis of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant Soil*, 43: 609-619, 1975.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxi cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Cienc. Solo*, 34: 349-360, 2010.

BANDEIRA, T. J. P. G., Caracterização fenotípica e genotípica, sensibilidade a antimicrobianos e detecção de genes de virulência de cepas clínicas e ambientais de *Burkholderia pseudomallei*. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal do Ceará, 2011.

BARNAWAL, D., BHARTI, N., MAJI, D., CHANOTIYA, C.S., KAIRA, A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase – containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58: 227-235, 2012.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotoras de crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. *Cienc. Agrotec. Lavras*, 32: 731-739, 2008.

BASHAN, Y. & BASHAN, L.E. Plant growth-promoting, in: *Encyclopedia of soils in the environmental*, 1: 103-111p., 2005.

BEATTIE, G. A., LINDOW, S. E. bacterial colonization of levels: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89: 353-359, 1999.

BEHRENDTS, V., BUNDY, J.G., WILLIAMS, H.D. Differences in strategies to combat osmotic stress in *Burkholderia cenocepacia* elucidated by NMR-based metabolic profiling. *Lett. Applied Microbiology*, 52(6): 619-625, 2011.

BERG, J. M. T. E LUBERT, J. *Bioquímica*. 6°. Ed. Guanabara Koogan, 545p., 2008.

BHATTACHARYYA, P.N., & JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28: 1327–1350, 2012.

BORDIEC, S., PAQUIS, S., LACROIX, H., DHONDT, S., BARKA, E. A., KAUFFMANN, S., JEANDET, P., MAZEYRAT-GOUBEYRE, F., CLEMENT, C., BAILLIEUL, F., DOREY, S. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 62 (2): 595–603, 2011.

BRAZ, T. G. S., CANELLAS, L. P., MEDICI, L. O. Bioatividade de Ácidos Húmicos em *Arabidopsis thaliana*. *Enciclopédia Biosfera*, 6(11): 1-9, 2010.

BROADBENT, P., BAKER, K. F., FRANKS, N. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedling in steamed and in nontreated soil. *Phytopatology*. 67(8): 1027-1034, 1977.

BRUSK, T. C. Comportamento da umidade d solo determinadas por métodos expeditos. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Federal de Santa Maria (UFRSM), 68p., 2013.

BULGARI, CASATI, P., CREPALDI, P., DAFFONCHIO, D., QUAGLINO, F., BRUSETTI, L., BIANCO, P.A., Restructuring of Endophytic Bacterial Communities in Grapevine Yellow-Diseased and Recovered *Vitis vinifera* L. Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 5018–5022, 2011.

CANELLAS, L.P.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L.B.; OLIVARES, F.L.; SPACCINI, R.; ZANDONADI, D.B. & FACANHA, A.R. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acids. *Chemosphere*, 78: 457-466, 2010.

CARARO, D.C.; DUARTE, S.N. Injeção de CO₂ e lâminas de irrigação em tomateiro sob estufa. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (3): 432-437, 2002.

CARDOSO, N.S.N., OLIVEIRA, L.M., FERNADEZ, L.G., PELACANI, C.R. SOUZA, C. L. M., OLIVEIRA, A. R. M. F. Osmocondicionamento na germinação de sementes, crescimento inicial e conteúdo de pigmentos de *Myracrodruon urundeuva fr. Allemão*. *Revista Brasileira de Biociências* , 10(4): 457-461, 2012.

CARRER FILHO, R., ROMEIRO, R. S., AMARAL L. S., GARCIA, F. A. O. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. *Horticultura Brasileira* 27: 340-344, 2009.

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

CHAPLA, V. M., BIASETTO, C. R., ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de Química*, 5 (3): 421-437, 2013.

CHAVES, A. M. A Cultura do Tomate. CONAB, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

CHEN, X. H., VATER, J., PIEL, J., FRANKE, P., SCHOLZ, R., SCHNEIDER, K., KOUMOUTSI, A., HITZEROTH, G., GRAMMEL, N., STRITTMATTER, A.W., GOTTSCHALK, G., SUSSMUTH, R.D., BORRIS, R. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *Journal Bacteriology*, 188: 4024-4036, 2006.

CHEN, L., LUO, S., XIAO, X., GUO, H., CHEN, J., WAN, Y., LI, B., XU, T., XI, Q., RAO, C., LIU, C., ZENG, G. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum L.* for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology* 46: 383–389, 2010.

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

CHOUDHARY, D.K., SHARMA, K.P., GAUR, R.K. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnol Lett*, 33:1905–1910, 2011.

COELHO, L. F. Interação de *Pseudomonas spp.* e *Bacillus spp.* com diferentes ambientes da rizosfera. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação do Instituto Agrônomo de Campinas, 2006.

COLETTI, C. & TESTEZLAF, R. Avaliação do uso da irrigação por sulcos na cultura do tomate sobre a disponibilidade hídrica em uma bacia hidrográfica. WORKSHOP TOMATE NA UNICAMP: Perspectivas e pesquisas. Campinas, 28 de maio de 2003.

CONTI, R., GUIMARAES, D.O., PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Ciência & Cultura* [online]. 64 (3): 43-47, 2012.

CROZIER, A., ARRUDA, P., JASMIM, J.M., MONTEIRO, A.M.; SANDEBERG, G. Analysis of índole-3-acetic and related indoles in culture media from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*: 54(11): 2833 – 2837, 1988.

DASTAGER, S. G., DEEPA, C. K., PANDEY, A. Potencial plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.), *World J. Microbiology Biotechnology*, 27: 259-265, 2011.

DIMKPA., C, WEINAND., T. & ASCH., F., Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* 32: 1682–1694, 2009.

DINESHA, R., ANANDARAJA, M., KUMARB, A., BINI, Y. K., SUBILA, K. P., ARAVIND, R. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant

growthpromoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*, 173: 34–43, 2015.

DOBBSS, L.B., MEDICI, L.O., PERES, L. E. P., PINO-NUNES, L. E., RUMJANEK, V. M., FAÇANHA, A. R., CANELLAS, L. P. Changes in root development of *Arabidopsis* promoted by organic matter from oxisols. *Annals of Applied Biology*, Warwickshire, 151:199-211, 2007.

EMMERT, E. A. B., HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. 171: 1-9, 1999.

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

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Biociências*, 9 (4): 533-541, 2011.

EWING, B. HILLIER, L., WENDL, M.C. and GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Research*. 8 (3): 175-85, 1998 (a).

EWING, B. and GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. *Genome Research*. 8 (3): 186-194, 1998(b).

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P., MANFRON, P.A, CASAROLI, D.; SIMON, J.; NETO, D. D. ; JONG VAN LIER, Q. ; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja- Revisão. *Revista da FZVA. Uruguaiana*, 14 (1): 89-106, 2007.

FAHY, P. C., HAYWARD, A. C. Media and methods for isolation and diagnostic test. In: Fahy, P. C., PRESLEY, G.J. (Eds) Plant bacterial disease a diagnostic guide. Sidney: Academic Press, 393p, 1983.

FARINA, R. Diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a cultura de canola (*Brassica napus L.*) cultivada no município de Vacaria, Rio Grande do Sul. Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 104p., 2012.

FEI, H.; VESSEY, J. K. Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the NH₄⁺-induced stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter GH3: gusA. *Physiologia Plantarum*, 12: 674–681, 2004.

FILHO, R. L. Isolamento e seleção de procariotos residentes de filoplano no tomateiro como potencial para o controle de doenças da cultura. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, 62p., 2008.

FLORES, H.G. Resistencia induzida por micorrización em tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) ante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Dissertação de mestrado. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México. 117p., 2008.

FRITSCH, T. E. Caracterização do sistema SALRCBA para metabolização de salicina em *Azospirillum amazonense*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biomedicina. Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2011.

GARCÍA, A. A., CARRIL, E. PÉREZ-URRIA. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (Biologia)*. Serie Fisiologia Vegetal, 2(3): 119-145, 2009.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. ed. New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag. p.119- 154, 2001.

GLICK, B.R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* 21: 383–393, 2003.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 251: 1-7, 2005.

GLICK, B.R., CHENG, Z., CZARNY, J., DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal Plant Pathology*, 119: 329-339, 2007.

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

GORDON, S. A., WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, Baltimore, 26 (1): 192-195, 1951.

GORDON, D., ABAJIAN, C., AND GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*. 8: 195–202, 1998.

GRIMONT, F. & GRIMONT, P. A. D., The Genus *Serratia*. *Prokaryotes*, 6: 219-244, 2006.

GUO, B., WANG, Y., SUN, X. & TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 136-142, 2008.

HADAR, Y & PAPADOPOULOU, K.K. Suppressive Composts: Microbial Ecology Links Between Abiotic Environments and Healthy Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:133–153, 2012.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O.; MIZUBUTI, E. S. G. Seleção de bactérias de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole para três patógenos foliares. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.26, p.488, 2001.

HALFELD-VIEIRA, B. A., ROMEIRO, R. S., MIZUBUTI, E. S. G., Métodos de isolamento de bactérias do filoplane de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 638-643, 2004.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. da S.; SILVA, H. S. A.; BARACT-PEREIRA, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 41(8): 1247-1252, 2006.

HONTZEAS, N., ZOIDAKIS, J., GLICK, B. R., ABU-OMAR, M.M. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the rizobacterium *Pseudomonas putida* UWA: a Key enzyme in bacterial planta growth promotion. *Biochimica e Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 1703: 11-19, 2004.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliensis*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina, Embrapa Soja, 36p., 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal (PAM) – 2014 - Brasil. <http://www.ibge.gov.br/>

JALILI, F., KHAVAZI, K., PAZIRA, E., NEJATI, A., RAHMANI, H.A., SADAGHIANI, H.R., MIRANSARI, M. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*, 166: 667-674, 2009.

JONES, J. B., JONES, J. P., STALL, R. E., ZITTER T. A. Compendium of tomato diseases. St. Paul: APS Press. 73p., 1991.

JOSEPH, B. & PRIYA, R.M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect: A Review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1 (3): 291-309, 2011.

JUNIOR, J. R. V., FERNANDES, C. F., MARCOLAN, A. L., SILVA, D. S. G., JUNIOR, H. A., REIS, N. D. Residentes de filoplano como potenciais controladores de doenças das plantas. Embrapa Rondônia, 16p., 2009.

KANG, SANG-MO, KHAN, A. L., WAQAS, M., YOU, YOUNG-HYUN, HAMAYUN, M., JOO, GIL-JAE, SHAHZAD, R., CHOI, KYUNG-SOOK. Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low temperature stress in *Capsicum annuum* L. European Journal of Soil Biology xxx: 1-9, 2015.

KAVAMURA, V. N. Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico. Tese apresentada à Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 82p., 2012.

KAVAMURA, V. N., SANTOS, S. N., JOÃO LUIZ DA SILVA, J. L., PARMA, M. M., ÁVILA, L. A., VISCONTI, A., ZUCCHI, T. D., TAKETANI, R. G., ANDREOTE, F. D., MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. Microbiological Research 168:183–191, 2013.

KHAN, A.L., KANG, SANG-MO, DHAKAL, K.H., HUSSAIN, J., ADNAN, M., KIM, JONG-GUK, LEE, IN-JUNG. Flavonoids and amino acid regulation in *Capsicum annuum* L. by endophytic fungi under different heat stress regimes. Scientia Horticulturae, 155: 1-7, 2013.

KUSARI, S., HERTEWECK, C., SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. Chemistry & Biology, 19: 792-798, 2012.

KUSS, A.V. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria/RS. 2006.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought; physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. Journal of Experimental Botany, 64 (1): 83- 108, 2013.

LEE, S., FLORES-ENCARNACION, M., CONTRERAS-ZENTALLA, M., GARCIA-FLORES, L., ESCAMILLA, J.E. AND KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *Journal of Bacteriology*, 186 (16): 5384-5391, 2004.

LOPES, A.A.C. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdades Integradas – Planaltina/DF, 2009.

LÓPEZ, C. L. A. Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Nacional da Colombia, 158p., 2012.

MALARKODI, C., RAJESHKUMAR, S., PAULKUMAR, K., VANAJA, M., JOBITHA, G., ANNADURAI, G. Bactericidal activity of bio mediated silver nanoparticles synthesized by *Serratia nematodiphila*. *Drug Invention Today*, 5:119-125, 2013.

MARIANO, R.L.R; SILVEIRA, E.B; ASSIS, S. M. P; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P; DONATO, V.M.T.S. Importância de bactéria promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, 1: 89-111, 2004.

MASCARUA-ESPARZA, M. A, VILLA-GONZALEZ, R. and CABALLERO-MELLADO, J. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil* 106: 91-95, 1988.

McCREE, K.J., FERNÁNDEZ, C.J. Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. *Crop Science*, Madison, 29: 353-360, 1989.

MEDEIROS, B. P., Estresse hídrico simulado por polietileno glicol 6000: Um estudo sobre os efeitos em planta de tomate, *Herbaspirillum seropedicae* e o potencial da inoculação na resistência ao estresse. Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade Estadual do \norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF. Campos dos Goytacazes, 78 p., 2013.

MICHEREFF, S. J. & BARROS, R. Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 368 p., 2001.

MRKOVACKI, N., MILIC, V. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. *Annals of Microbiology*, 51: 145-158, 2001.

MUHAMMAD, S., MUHAMMAD., A., HUSSAIN.S., BHATTI, A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34: 635–648, 2007.

NAIAKA, S., JEUDE, J. V. L., GOFFAU, M., HILMI, M., DAM van B. A cultura do tomate – produção, processamento e comercialização. Fundação Agromisa e CTA, Wageningen, 2006.

NASCIMENTO, V. S. F. Doença de veiculação hídrica em trechos da Bacia do Rio Piranha-Assu: ocorrência de bactérias oportunistas, caracterização epidemiológica e concepções de professores e agentes de saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-graduação em desenvolvimento e meio ambiente /PRODEMA. Dissertação de Mestrado, 2011.

NAUTIYAL, C. S., An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270, 1999.

NAVEED, M., MITTER, B., REICHENAUER, T. G., WIECZOREK, K., SESSITSCH, A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter sp.* FD17. *Environmental and Experimental Botany* 97: 30– 39, 2014.

NETO, P. A. S. P., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos. *Biociência* 29: 62-76, 2002.

NISSINEN, R. M. ; MÄNNISTÖ, M.K. ; ELSAS, J. D. Endophytic bacterial communities in three arctic plants from low arctic fell tundra are cold-adapted and host-plant specific. *FEMS Microbiology Ecology*, 82: 510-522, 2012.

NOORI, M.S. S., SAUD, H. M. Potential Plant Growth-Promoting Activity of *Pseudomonas sp* Isolated from Paddy Soil in Malaysia as Biocontrol Agent. *J Plant Pathology & Microbiology*, 3(2):1-4, 2012.

NORMANLY, J. Approaching cellular and molecular resolution of auxina biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harb, Perspective Biology*, 2:a001594, 2010.

OLIVEIRA, M. F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola do Ambiente. UFRGS, 2003.

OLIVEIRA, L. K. X.; Moitinho, B. M.; Almeida, A.S.; Roque, M. R. A. Prospecção do gene *acdS* em rizobactérias isoladas de plantas do semi-árido. 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

ONOFRE-LEMUS, J., HERÁNDEZ-LUCAS, I., GIRARD, L., CABALLERO-MELLADO, J. ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, p.6581-6590, 2009.

PEDRINHO, E. A. N., JUNIOR, R. F. G., CAMPANHARO, J. C., ALVES, L. M.C., LEMOS, E. G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, 69 (4): 905-911, 2010.

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

PEIXOTO, A. R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. *Ciência Rural*, 27(1): 153-160, 1997.

PETROZZA, A., ANTONIETTA SANTANIELLO, A., SUMMERER, S., DI TOMMASO, G., DI TOMMASO, D., PAPARELLI, E., PIAGGESI, A., PERATA, P., CELLINI, F. Physiological responses to Megafol® treatments in tomato plants under drought stress: A phenomic and molecular approach. *Scientia Horticulturae*, 174: 185–192, 2014.

PEREIRA, M. R. R., MARTINS, C. C., SOUZA, G. S. F., MARTINS, D. Influência do estresse hídrico e salino na germinação de *Urochloa decumbens* e *Urochloa ruziziensis*. *Bioscience Journal*, 28(4): 537-545, 2012.

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

PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. Editora: Edur, UFRRJ – Seropédica, 192p., 1995.

QIN, S., XING, K., JIANG, J. H., XU, L. H. & LI, W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 89: 457-473, 2011.

QIU, M., XIE, R.S., SHI, Y., ZHANG, H. & CHEN, H.M. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Annual Microbiology*, 60: 143-150, 2010.

RAJKUMAR, M., AE, N., PRASAD, M. N. V. FREITAS, H. Potencial of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnology*, 28: 142-149, 2010.

RAJKUMAR, M., AE, N., FREITAS, H. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77: 153-160, 2009.

RASHID, S., CHARLES, T.C., GLICK, B.R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology*, 61: 217-224, 2012.

ROMEIRO, R. S. Organismos procariotas e promoção de crescimento em plantas. Viçosa: Editora UFV, 2007.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319 – 339, 1999.

RODRIGUES, E. P., OLIVEIRA, A. L. M., VIDAL, M. S., SIMÕES-ARAÚJO, J. L., BALDANI, J. I. Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de auxinas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – EMBRAPA Agrobiologia*, 2007. 20p.

SANTOS, R. F. & CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 2(3): 287 - 294, 1998.

SANTOS, L. S., RHODEN, S.A., BARROS, I. T., TONINI, R. C. G., MARQUES, R. M., SOUZA, V. H. E., PAMPHILE, J. A. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. *Sabios: Revista Saúde e Biologia*, 8 (1): 92-101, 2013. <http://www.revista.grupointegrado.br/sabios>.

SARWAR, M., KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford 20: 282-285, 1995.

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

SHAHZAD, S.M., ARIF, M.S., RIAZ, M., IQBAL, Z., ASHRAF, M. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays L.*) under fertilized conditions. *European Journal of Soil Biology*, 57: 27-34, 2013.

SHTEREVA, L.; ATANASSOVA, B.; KARCHEVA, T.; PETKOV, V. The effect of water stress on the growth rate, water content and proline accumulation in tomato calli and seedlings. *ISHS Acta Horticulturae* 789: [XV Meeting of the EUCARPIA Tomato Working Group](#), 2008.

SHI, J., LIU, A., LI, X., FENG, S., CHEN, W. Inhibitory mechanisms induced by the endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. *Biological Control*, 56: 2-8, 2011.

SIDDIKKEE, M.A., GLICK, B.R., CHAUHAN, P.S., YIM, W.J., SA, T. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 427-434, 2011.

SIDDIQUI, Z.A. Effects of plant growth promoting bacteria and composed organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. *Bioresource Technology*, 95 (2): 223-227, 2004.

SILVA, J. R. C. Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da pinta bacterianas do tomateiro. 160 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SILVA, A. C., CANELLAS, L. P., OLIVARES, F. L., DOBBSS, L. B., AGUIAR, N. O., FRADE, D. A. R., REZENDE, C. E., PERES, L. E. P. Promoção de crescimento radicular em plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. *Revista Brasileira, Ciência e Solo*, 35:1609-1617, 2011.

SILVA, J. R. C., SOUZA, R. M. S., ZACARONE, A. B., SILVA, L.H.C.P., CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae pv*

tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. Ciênc. agrotec., Lavras, 32(4):1062-1072, 2008.

SILVA, P. O. Inter-relações entre o estresse salino e a biossíntese de etileno no controle de sementes de *Stylosanthes*. Dissertação de Mestrado apresentado à Universidade Federal de Visoça. 48 fls., 2013.

SILVA, T. F, SANTOS, P. T. D., SANTARÉM, E. R. Crescimento e Metabolismo Secundário de *Hypericum perforatum L.* em presença de rizobactérias do gênero *Streptomyces*. X Salão de Iniciação Científica, PUCRS, 2009.

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

SILVEIRA, A. P. D., FREITAS, S. S. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Instituto Agrônômico. Campinas, SP, 312 p., 2007.

SILVEIRA, A. B. Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2008.

SOBRAL, J. K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 174p., 2003.

STROBEL G. A., DAISY B. H., CASTILLO U., HARPER J. Natural products from endophytic microorganisms. Journal Natural Production, 67: 257-268, 2004.

STURTZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. Plant and Soil, Dordrecht, 175: 257-263, 1995.

SZENTES, S., RADU, G-L., LASLO, E., LÁNYI, S., MARA, G. Selection and evaluation of potencial biocontrol rhizobacteria from a raised bog environment. *Crop Protection*, 52: 116-124, 2013.

SUNDARAMOORTHY, S., RAGUCHANDER, T., RAGUPATHI, N., SAMIYAPPAN, R. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annuum L.* caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, 60: 59-67, 2012.

TAIZ, L., ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 5^a ed., Editora Artmed, 918p., 2013.

TARGA, S.E.M., ORLANDELL, R.C., BERNARDI-WENZEL, J., CONTE, H., PAMPHILE, J.A. Influence of crude extracts of endophytes from *Luehea divaricata* (*Malvales; Tiliaceae*) on the in vitro development of *Diatraea saccharalis* (*Lepidoptera; Crambidae*) larvae. *SaBios: Revista Saúde e Biologia*, 6 (3): 01-07, 2011.
<http://www.revista.grupointegrado.br/sabios/>

TIWARI, RASHMI ; AWASTHI, ASHUTOSH ; MALL, MANEESHA ; SHUKLA, ASHUTOSH K. ; SRINIVAS, K.V.N. SATYA ; SYAMASUNDAR, K.V. ; KALRA, ALOK. Bacterial endophyte-mediated enhancement of in planta content of key terpenoid indole alkaloids and growth parameters of *Catharanthus roseus*. *Industrial Crops & Products*, 43: 306-310, 2013.

TURNER, N. C. Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Austr. J. Plant Physiology*, 43: 175-190

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F.J., LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40, 1994.

WAN, Y., LUO, S., CHEN, J., XIAO, X., CHEN, L., ZENG, G., LIU, C., HE, Y. Effect of endophyte-infection on growth parameters and Cd-induced phytotoxicity of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum L.* *Chemosphere*, 89: 743-750, 2012.

YANG, J., KLOEPPER, J. W., RYU, CHOONG-MIN. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trend in Plant Science*, vol.14 (1): 1-4, 2009.

YIM, W., SESHADRI, S., KIM, K., LEE, G., SA, T. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium spp.* Inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum Mill*) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 67: 95-104, 2013.

ZHANG, C. & HUANG, Z., Effects of endogenous abscisic acid, jasmonic acid, polyamines, and polyamine oxidase activity in tomato seedlings under drought stress. *Scientia Horticulturae* 159: 172–177, 2013.

ZHANG, CHANG-XING, YANG, SHOU-YUN, XU, MING-XU, SUN, JIE, LIU, HUAN, LIU, JING-RUI, LIU, HUI, KAN, FEI, SUN, JING, LAI, REN and ZHANG, KE-YUN. *Serratia nematodiphila sp. nov.*, associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 1603–1608, 2009.

ZHANG, YAN-FENG, HE, LIN-YAN, CHEN, ZHAO-JIN, WANG, QING-YA, QIAN, M., SHENG, XIA-FANG (a). Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, 83: 57-62, 2011.

ZHANG, YAN-FENG, HE, LIN-YAN, CHEN, ZHAO-JIN, ZHANG, WEN-HUI, WANG, QING-YA, QIAN, M., SHENG, XIA-FANG (b). Characterization of lead-resistant and ACC-deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 1720-1725, 2011.