



GINAINI GRAZIELLI DOIN DE MOURA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO VEGETAL NA CULTURA DO
MORANGUEIRO**

LAVRAS – MG

2019

GINAINI GRAZIELLI DOIN DE MOURA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL NA
CULTURA DO MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de Mestre.

Prof^ª. Dr^ª. Joyce Dória
(Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Rosane Freitas Schwan
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Eduardo Alves
(Co-orientador)

LAVRAS - MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Moura, Ginaini Grazielli Doin de.

Seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal na
cultura do morangueiro / Ginaini Grazielli Doin de Moura. - 2019.
162 p. : il.

Orientador(a): Joyce Dória.

Coorientador(a): Rosane Freitas Schwan, Eduardo Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. 2. Interação
planta-microrganismo. 3. Inoculação. I. Dória, Joyce. II. Schwan,
Rosane Freitas. III. Alves, Eduardo. IV. Título.

GINAINI GRAZIELLI DOIN DE MOURA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO
VEGETAL NA CULTURA DO MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de julho de 2019

Prof^ª. Dr^ª. Joyce Dória, UFLA

Prof^ª. Dr^ª. Fátima Maria de Souza Moreira, UFLA

Prof^ª. Dr^ª. Kátia Schwan-Estrada, UEM

Prof^ª. Dr^ª. Joyce Dória Rodrigues

Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

*Aos meus pais, Gilberto de Moura e Ana Paula Goulart Doin, pelo apoio, pelo amor
incondicional e por serem meu maior exemplo de vida.
À minha irmã, Giovana Cristina Doin de Moura, por ser a melhor parceria que eu poderia
desejar na vida.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, à Deus e à Santa Rita de Cássia por serem fonte de força e proteção e por sempre estarem comigo.

Aos meus pais, Gilberto de Moura e Ana Paula Goulart Doin, por sempre acreditarem em mim, pelas orações, pela preocupação, pelo amor incondicional, pelo apoio e por serem o maior exemplo de amor ao próximo, honestidade, de humildade e de trabalho sério que tenho na vida.

À minha amada irmã, Giovana Cristina Doin de Moura, pelo apoio, pela amizade, por nossa cumplicidade, por toda a felicidade que adiciona à minha vida e por ser o maior exemplo de bondade que tenho na vida.

Às minhas avós, Risoleta Goulart (*in memoriam*) e Terezinha Doin (*in memoriam*), que sempre acreditaram em mim e me deram força até quando puderam.

À prof.^a Dr.^a Joyce Dória pela orientação, pelas sugestões, pela liberdade que me deu durante a condução dos experimentos e pela confiança que em mim foi depositada para conduzi-los.

À Prof.^a Dr.^a Rosane Freitas Schwan e ao Prof. Dr. Eduardo Alves por aceitarem ser meus co-orientadores, por todo o auxílio, por toda a estrutura disponibilizada para a condução dos experimentos.

Ao prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Villas Boas por toda a estrutura disponibilizada para a realização dos ensaios de qualidade de pseudofrutos e pelo financiamento de análises cromatográficas.

Aos meus ex-orientadores, Dr. Paulo Emílio Lovato e Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares por tudo o que me ensinaram e porque, apesar de ter trocado de casa, continuei batendo à porta deles e eles sempre abriram com um sorriso no rosto.

Ao Prof. Dr. Giorgini Augusto Venturieri (*in memoriam*), que me abriu os olhos para coisas que eu não compreendia e com quem tive a honra de ter discussões maravilhosas sobre simbiose, sobre cooperação entre espécies e sobre evolução de organismos simbióticos. Hoje, deixa ensinamentos e saudades.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), Adriano Francis Dorigan, Dérica Gonçalves Tavares, Yaya Kone, Tamara Leite dos Santos, Indiara Pinheiro, Elisa de Melo Castro, Aline Norberto Ferreira e Silvino Intra Moreira. Esse laboratório é, na verdade, uma família que me acolheu. Muito obrigada por todo o auxílio

durante os experimentos e também por todos os momentos bons e repletos de alegria que compartilhamos. Foi um imenso prazer trabalhar e conviver com todos!

À amiga querida Aline Vieira de Barros por todo o auxílio durante o desenvolvimento dos experimentos. Não consigo pensar em um experimento em que ela não estivesse presente para ajudar. Muito obrigada também pela amizade valiosa que construímos.

Ao amigo Franklin Machado por todo o auxílio com as análises estatísticas.

Ao pós-doutorando Adalvan Daniel Martins e ao técnico Silvio Antônio Calazans de Freitas pelas sugestões e por todo o auxílio com as análises fisiológicas de plantas.

À doutoranda Bruna Nadalete e ao técnico Ítalo Antônio Fernandes por todo o auxílio durante as análises anatômicas de plantas.

Ao doutorando Rafael Carvalho do Lago e à mestranda Ana Beatriz Silva Araújo por todos os dias em que me auxiliaram durante as análises de qualidade de pseudofrutos.

À empresa Multiplanta, especialmente ao sr. Márcio de Assis, pela doação de todas as mudas de morangueiro utilizadas durante os ensaios.

A todos os mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos dos Laboratórios de Fermentações, Microbiologia Ambiental e Industrial e de Cogumelos pela boa convivência.

Ao técnico Paulinho, pela atenção e carinho. À técnica Cidinha, pela preocupação, pela atenção, por todo o carinho e cuidado que dedica à todos os estudantes. À técnica Ivani, pela boa convivência e por todo o auxílio durante os experimentos.

Às amigas Lundoï Tobias Lee e Aline Oliveira Silva, por terem feito meus dias mais alegres, por todo o apoio, por toda a força, pela amizade, por todas as conversas e por todos os momentos bons que compartilhamos.

À minha turma de mestrado pela convivência, pelos tantos sorrisos, por todos os trabalhos e todas as revisões em grupo.

À secretária Rose, por todo o auxílio com documentos e pela paciência para responder as muitas questões.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o período de mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela formação e pela disponibilização da estrutura necessária para o desenvolvimento dos experimentos.

À todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!!

“A visão da evolução como uma competição sangrenta crônica entre indivíduos e espécies, uma distorção popular da noção de ‘sobrevivência do mais forte’ de Darwin, dissolve-se diante de uma nova visão de cooperação contínua, forte interação e dependência mútua entre formas de vida. A vida não dominou o mundo pelo combate, mas pelo networking. As formas de vida se multiplicaram e complexificaram cooptando os outros, não apenas matando-os.” (Lynn Margulis)

RESUMO GERAL

O morango (*Fragaria ananassa*, Duch.) é um pseudofruto apreciado no mundo inteiro. Entretanto, a produção e produtividade nacional têm sido alcançadas através da aplicação de agrotóxicos nos campos produtivos para o controle de fitopatógenos, bem como de fertilizantes químicos altamente solúveis no solo, práticas que podem ocasionar problemas ambientais a médio e longo prazo e aumentar custos de produção. Nesse contexto, bactérias promotoras de crescimento vegetal têm apresentado potencial de aplicação na produção agrícola, em especial porque esses microrganismos apresentam capacidade de estimular o crescimento de plantas através de síntese de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e controle biológico de fitopatógenos. Objetivou-se, com esse trabalho, avaliar *in vivo* e *in vitro* o potencial de promoção de crescimento e de controle biológico de bactérias isoladas de folhas e raízes de morangueiro, bem como avaliar seus principais efeitos sobre mudas dessa espécie vegetal. Com essa finalidade, foram realizados testes *in vitro* de solubilização de fosfatos, de síntese de auxinas, de fixação biológica de nitrogênio, de antagonismo ao fungo *Botrytis cinerea* e de produção de compostos antifúngicos voláteis. Os efeitos dos compostos antifúngicos sobre o fitopatógeno ainda foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de promoção de crescimento vegetal *in vivo*, com inoculação em plantas de morangueiro e quanto à capacidade de controle biológico, com inoculação em frutas. Dados biométricos foram coletados e mudanças anatômicas e fisiológicas em plantas inoculadas foram avaliadas por microscopia e em analisador IRGA (infrared gas analyser), respectivamente. Avaliou-se, ainda, acúmulo de nitrogênio e fósforo em plantas inoculadas e não inoculadas. Em um segundo experimento, avaliou-se o efeito da inoculação sobre produção e qualidade de pseudofrutos, assim como volatiloma e composição em fenólicos de pseudofrutos. Cinco isolados selecionados *in vitro* e a estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*) foram capazes de estimular o crescimento vegetal e controlar o fungo *B. cinerea*. O isolado MET12M2 promoveu maiores efeitos sobre o crescimento, acúmulo de nutrientes, anatomia, fisiologia, produtividade e qualidade de pseudofrutos. O perfil de voláteis e fenólicos em pseudofrutos variou conforme o isolado inoculado. Entre os cinco isolados selecionados *in vitro*, todos promoveram alterações visíveis em hifas de *B. cinerea* e o isolado 29 apresentou maior potencial de controle biológico do fitopatógeno. Conclui-se que as bactérias endofíticas testadas e selecionadas neste trabalho apresentam potencial para aplicação enquanto promotoras de crescimento em morangueiro e que seus efeitos abrangem crescimento, produtividade, qualidade de pseudofrutos, anatomia, fisiologia e acúmulo de nutrientes pelas plantas, além de efeitos diretos sobre o crescimento de fitopatógenos.

PALAVRAS-CHAVE: controle biológico, morango, *Botrytis cinerea*, interação planta-microrganismo, rizobactérias, endofíticos, inoculação.

GENERAL ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch.) as a fruit appreciated worldwide. However, many of the results of national production and productivity have been achieved through the application of agrochemicals in the productive fields for the control of phytopathogens, as well as chemical soluble fertilizers in the soil, practices that can cause several environmental problems in the medium and long term and increase production costs. In this context, plant growth-promoting bacteria have potential applications in agricultural production, especially since these microorganisms have the capacity to stimulate plant growth through auxin synthesis, biological nitrogen fixation, phosphate solubilization and biological control of phytopathogens. The aim of this work was to evaluate in vivo and in vitro the potential of promoting growth and biological control of bacteria isolated from leaves and roots of strawberry, as well as to evaluate their main effects on strawberry plants. For this purpose, in vitro tests of phosphate solubilization, auxin synthesis, biological nitrogen fixation, antagonism to *Botrytis cinerea* and volatile antifungal compounds production were carried out. The effects of the antifungal compounds on the phytopathogen were still evaluated by scanning electron microscopy. The isolates were evaluated for plant growth promotion capacity in vivo, by inoculation in strawberry plants; and the capacity of biological control, by inoculation in fruits. Biometric data were collected and anatomical and physiological changes in inoculated plants were evaluated by microscopy and IRGA analyzer (infrared gas analyzer), respectively. It was also evaluated the nitrogen and phosphorus accumulation in inoculated and non-inoculated plants. In a second experiment, the effect of inoculation on yield and fruit quality, as well as volatilome and fruit phenolic composition were evaluated. Five isolates selected in vitro and the Ab-V5 isolate (*Azospirillum brasilense*) were able to induce plant growth and control *B. cinerea*. The MET12M2 isolate promoted greater effects on growth, nutrient accumulation, anatomy, physiology, fruit production and fruit quality. The volatile and phenolic profile in fruits varied according to the inoculated isolate. Among the five isolates selected in vitro, all promoted visible changes in *B. cinerea* hyphae and the 29 isolate presented a greater biological control potential of the phytopathogen. We conclude that the endophytic bacteria tested and selected in this study present potential for application as growth-promoters in strawberry and its effects include growth, production, fruit quality, anatomy, physiology and nutrient accumulation by plants, as well as direct effects on the growth of phytopathogens.

KEYWORDS: biological control, strawberry, *Botrytis cinerea*, plant-microorganism interaction, rhizobacteria, endophytes, inoculation

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO/VISÃO GERAL DO TRABALHO..... | 12 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 14 |
| 2.1 Aspectos gerais sobre a cultura do morango..... | 14 |
| 2.2 Sustentabilidade no sistema agrícola de produção..... | 16 |
| 2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal..... | 19 |
| 2.4 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal..... | 23 |
| 2.4.1 Mecanismos diretos de promoção de crescimento..... | 23 |
| 2.4.1.1 Fixação biológica de nitrogênio..... | 23 |
| 2.4.1.2 Solubilização de fosfato..... | 25 |
| 2.4.1.3 Produção de ácido indol-acético..... | 28 |
| 2.4.1.4 Efeitos da aplicação de inoculação de BPCP em espécies de interesse..... | 29 |
| 2.4.2 Mecanismos indiretos de promoção de crescimento..... | 32 |
| 2.4.2.1 Controle biológico..... | 32 |
| 2.4.2.1.1 Mofo cinzento (<i>Botrytis cinerea</i> Pers.) em morango..... | 35 |
| 3 REFERÊNCIAS..... | 38 |
| | |
| SEGUNDA PARTE – ARTIGOS..... | 51 |
| | |
| SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MORANGUEIRO..... | 51 |
| 1 Introdução..... | 53 |
| 2 Material e métodos..... | 54 |
| 3 Resultados e discussão..... | 60 |
| 4 Conclusão..... | 75 |
| Referências..... | 76 |
| Material complementar..... | 84 |
| | |
| EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA ANATOMIA FOLIAR E FISIOLOGIA DE MORANGUEIRO..... | 88 |
| 1 Introdução..... | 90 |
| 2 Material e métodos..... | 91 |
| 3 Resultados e discussão..... | 94 |
| 4 Conclusão..... | 104 |
| Referências..... | 105 |
| | |
| EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO SOBRE PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DE PSEUDOFRUTOS EM MORANGUEIRO..... | 109 |
| 1 Introdução..... | 111 |
| 2 Material e métodos..... | 112 |
| 3 Resultados e discussão..... | 116 |
| 4 Conclusão..... | 130 |
| Referências..... | 131 |

| | |
|---|------------|
| CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Botrytis cinerea</i> POR BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ISOLADAS DE MORANGUEIRO..... | 135 |
| 1 Introdução..... | 137 |
| 2 Material e métodos..... | 139 |
| 3 Resultados e discussão..... | 143 |
| 4 Conclusão..... | 155 |
| Referências..... | 156 |

INTRODUÇÃO GERAL/ VISÃO GERAL DO TRABALHO

O morango é um pseudofruto muito apreciado e consumido no mundo devido à características organolépticas e nutricionais. Atualmente, é produzido em zonas tropicais, subtropicais e temperadas. Entretanto, por ser uma cultura demandante em termos de fertilidade química do solo e susceptível à fitopatógenos, seu cultivo ainda é realizado de forma intensiva com aplicação de fertilizantes e agrotóxicos em campos produtivos. Essas práticas podem estar relacionadas a efeitos ambientais, além de possíveis conseqüências para a saúde pública a médio e longo prazo e aumento dos custos de produção.

Portanto, são necessárias mudanças nas estratégias de produção desse pseudofruto, sobretudo com a busca por formas de cultivo ambientalmente corretas, seguras do ponto de vista de saúde pública e viáveis do ponto de vista econômico.

Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento pode apresentar grande potencial de aplicação na produção de morango. Bactérias promotoras de crescimento são microrganismos capazes de desenvolver interações harmônicas com plantas e estimular seu crescimento através de diferentes mecanismos, como produção de auxinas, solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e controle biológico de fitopatógenos.

De modo geral, vegetais são naturalmente colonizados por essas bactérias, seja de forma endo ou epifítica e seus principais efeitos já relatados sobre as plantas estão relacionados ao estímulo da produção de matéria seca de parte aérea e raízes, aumento do teor de auxina em tecidos vegetais, modulação do metabolismo vegetal, indução de respostas de defesa de plantas, aumento da produtividade, aumento da área foliar, aumento da taxa de germinação de sementes, aumento no teor de clorofila de folhas, controle de fitopatógenos, além do estímulo de tolerância de plantas a estresse. Modificações fisiológicas, anatômicas e de qualidade de frutos também têm sido descritas como resultantes da inoculação dessas bactérias em plantas.

Entretanto, devido a interação entre planta e bactéria, é importante a seleção de isolados eficientes para cada espécie vegetal de interesse. Sendo assim, uma forma de ter acesso a esses microrganismos é por meio de pesquisas de seleção direta de isolados eficientes com relação à capacidade de colonização e promoção de crescimento sobre a espécie vegetal em que objetiva-se aplicá-los. Além disso, muitos dos efeitos desses organismos sobre planta são potencialmente estirpe-dependentes, o que gera a necessidade pela busca de isolados eficientes para a promoção de crescimento, mesmo dentro de uma mesma espécie bacteriana.

Portanto, objetivou-se, com esse trabalho, avaliar *in vivo* e *in vitro* o potencial da promoção de crescimento de plantas de morango e o controle biológico de *Botrytis cinerea* por bactérias isoladas de folhas e raízes de morangueiro, bem como avaliar seus principais efeitos sobre mudas dessa espécie vegetal.

Resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial de promoção de crescimento vegetal direta e indireta (contra o fitopatógeno *B. cinerea*) por alguns dos isolados testados. Além disso, à conhecimento, o presente trabalho é um dos poucos e recentes relatos de modificações anatômicas, fisiológicas e de qualidade de pseudofrutos de morangueiro após inoculação com bactérias promotoras de crescimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos gerais sobre a cultura do morango

O morangueiro (*Fragaria x ananassa*, Duch.) é uma espécie resultante do cruzamento entre as espécies nativas *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana* e pertence à família Rosaceae (SANTOS; MEDEIROS, 2003; SILVA; DIAS; MARO, 2007; CHANDLER et al., 2012; FILGUEIRA, 2013). O cultivo de espécies de *Fragaria* iniciou-se nas civilizações indígenas da América Pré-Colombiana e passou a ser realizado a partir do século XIV na Europa, sendo a espécie inicialmente cultivada para fins ornamentais. A espécie *Fragaria ananassa* (morangueiro mais conhecido atualmente) é originária dos jardins europeus, quando clones de fêmeas de *Fragaria chiloensis* do Chile foram cruzados com clones de *Fragaria virginiana* importados da América do Norte. Ainda que não planejado, os híbridos trouxeram consigo a produtividade e rusticidade da espécie *F. virginiana* e o tamanho maior de fruta de *F. chiloensis* (CHANDLER et al., 2012). Após o sucesso na Europa, os europeus iniciaram o cultivo de morangueiro na América, sendo o mesmo difundido no Chile e na América do Norte (DIAS; COSTA, 2007; ANTUNES; CARVALHO, 2011). Portanto, mesmo sendo nativa de regiões de clima temperado da Europa, Mediterrâneo e das Américas (ANTUNES; CARVALHO, 2011), o morangueiro passou a ser cultivado no mundo todo devido à rápida adaptação a diferentes condições climáticas (SILVA; DIAS; MARO, 2007; CHANDLER et al., 2012). Dados indicam que a produção de morangos no mundo ultrapassa 9 milhões de toneladas, com uma produtividade média de aproximadamente 22,5 t ha⁻¹, sendo a mesma realizada em uma área cultivada superior a 400 mil hectares. Atualmente, os países com maior produção do pseudofruto são China, Estados Unidos, México, Turquia, Egito, República da Coreia, Polônia, Rússia e Japão (FAO, 2019).

O cultivo do morangueiro no Brasil começou a expandir-se a partir do ano 1960, em especial pelo lançamento da variedade Campinas (PASSOS, 1996), sendo produzido atualmente por diferentes estados no país, destacando-se entre eles Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Apesar de o interesse pela produção dessa fruta ter aumentado muito no Brasil, inclusive com produções em grande escala, a produção de morango ainda é realizada majoritariamente na agricultura familiar, por pequenos produtores rurais e a maior parte da produção se destina ao mercado interno, sendo a produtividade média por estado de 32,7t/ha no Rio Grande do Sul, 25,2t/ha em Minas Gerais e 34 t/ha em São Paulo (CEASAMINAS, 2006; EMBRAPA, 2016). Segundo dados da FAO, a produção brasileira de morangos

ultrapassa 3.300 toneladas e é realizada em 400 hectares, majoritariamente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul (FAO, 2019). Apesar de o país não ser considerado um dos maiores produtores e/ou exportadores mundiais, destaca-se por apresentar condições ambientais favoráveis à produção da fruta na quase totalidade dos meses do ano (ANTUNES; REISSER JUNIOR, 2007). Entre os estados produtores, Minas Gerais destaca-se como maior produtor de morango do país, com mais de 40% da produção nacional (CEASAMINAS, 2006; FAO, 2019).

O morangueiro é uma planta herbácea, rasteira e estolonífera, com sistema radicular fasciculado e superficial. A espécie apresenta ciclo perene, porém é normalmente cultivada como anual (isso porque plantas jovens tendem a apresentar mais qualidade de pseudofrutos e produtividade). As folhas desses vegetais podem conter 3 a 5 folíolos e as flores encontram-se agrupadas em inflorescências, são completas, geralmente auto-férteis, possuem inúmeros pistilos e cálice pentâmero. A polinização dessa espécie vegetal ocorre pela ação de insetos e pelo vento (SILVA; DIAS; MARO, 2007; CHANDLER et al., 2012). Os frutos do morangueiro são, na verdade, considerados pseudofrutos, uma vez que os frutos verdadeiros são os aquênios, ou seja, estruturas pequenas e escuras que se prendem ao receptáculo carnoso hipertrofiado e de coloração vermelha, parte que é comercialmente conhecida como a fruta (FILGUEIRA, 2013). Cada aquênio é originado de um dos múltiplos pistilos da flor (CHANDLER et al., 2012). O florescimento do morangueiro é, sobretudo, dependente da temperatura e do fotoperíodo aos quais as plantas são submetidas, sendo que altas temperaturas levam à produção de pseudofrutos com pouco sabor, alta acidez e pouco firmes; fotoperíodos curtos induzem a fase reprodutiva; e fotoperíodos longos induzem a fase vegetativa da planta (CHANDLER et al., 2012; FILGUEIRA, 2013).

Além de possuir características organolépticas apreciadas no mundo todo (em termos de sabor, coloração e aroma), o pseudofruto ainda apresenta propriedades nutracêuticas muito interessantes, sendo composto por 91,5% de água, 6,8g de carboidratos, 0,9g de proteínas, 1,7g de fibras, 11mg de cálcio e 10mg de magnésio, além das vitaminas A, B e C, elementos como fósforo, ferro, potássio, cobre e zinco (composição em 100g de fruta, de acordo com a edição mais recente da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, 2011). O sabor adocicado do pseudofruto deve-se à presença de açúcares, componentes majoritários entre os sólidos solúveis. A glicose e a frutose são os açúcares predominantes em sua composição (WANG; CAMP, 2000; TODESCHINI *et al.*, 2018). Em termos de abundância, após os açúcares, os ácidos orgânicos não voláteis são os componentes de maior importância, possuindo importância na qualidade organoléptica da fruta, influenciando o pH celular e a

estabilidade de antocianinas, importantes para a coloração avermelhada da fruta. O ácido orgânico mais abundante no morango é o ácido cítrico, mas o pseudofruto ainda contém grandes quantidades de ácido málico e outros ácidos em menor quantidade (KADER, 1991; TODESCHINI *et al.*, 2018). A principal antocianina presente no morango é a pelargonidina-3-glucosídeo e a segunda mais importante é a cianidina-3-glicosídeo, sendo essas responsáveis por sua coloração característica. Além disso, o aroma característico do morango deve-se principalmente a seu conteúdo de ésteres voláteis. É importante ressaltar que, além das antocianinas, o pseudofruto ainda contém outros compostos antioxidantes, como flavonóides e ácidos fenólicos (AZEVEDO, 2007; TODESCHINI *et al.*, 2018).

Com o início da produção comercial de morango, muitos estudos têm sido realizados visando atingir maior produtividade e melhor qualidade de pseudofrutos, sendo conhecidos atualmente mais de 40 programas de melhoramento genético de morango no mundo. As características desejadas variam muito entre os programas, sendo expressas no aumento do tamanho e do número de pseudofrutos produzidos, maior resistência da polpa, firmeza da epiderme, coloração de pseudofrutos, sabor, exigência ao frio e resposta à fotoperíodo e temperatura. Além disso, pode-se dizer que o melhoramento genético aportou às plantas de morangueiro maior resistência à doenças e prolongamento da vida de prateleira de pseudofrutos (SANTOS, 1999; CHANDLER *et al.*, 2012; GALVÃO, 2014). Concernente à resposta às condições ambientais, a grande maioria das cultivares de morangueiro utilizadas atualmente pode ser classificada em cultivares de dia curto (florescem em condições de fotoperíodo curto, menor do que 12 horas e temperatura baixa) e cultivares de dias neutros (cultivares que independem do comprimento do dia para entrar em floração, porém dependem de temperaturas suficientemente altas para manter a frutificação). As principais cultivares utilizadas no Brasil provém dos Estados Unidos, destacando-se Aromas, Camarosa, Oso Grande, Camino Real, Diamante, Dover, Sweet Charlie e Ventana, além da espanhola Milsei-Tudla e das brasileiras advindas de programas da Embrapa Clima Temperado Burkley, Santa Clara e Vila Nova (OLIVEIRA; NINO; SCIVITTARO, 2005; ANTONIOLLI *et al.*, 2007; CHANDLER *et al.*, 2012).

2.2 Sustentabilidade no sistema agrícola de produção

Estimativas indicam um crescimento de 35% da população mundial até o ano de 2050, o que exigirá um aumento de 60% da produção agrícola em relação à produção atual (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012). Embora a agricultura nacional esteja em ascensão

no cenário agrícola mundial apresentando altas produtividades, muitos desses resultados foram alcançados via utilização de agrotóxicos para o controle de fitopatógenos e pragas, bem como de fertilizantes químicos altamente solúveis para a promoção de crescimento vegetal. Com relação à esse tipo de produto, tem-se observado que grande parte de defensivos e fertilizantes é perdida, sendo carregados para corpos d'água e para o solo, ocasionando contaminação ambiental (eutrofização de corpos d'água, salinização do solo, entre outros), além de efeitos sobre organismos não-alvos e desbalanços no equilíbrio ecológico das espécies desses ecossistemas. Além disso, é importante ressaltar que esses produtos são, muitas vezes, aplicados de forma indiscriminada e em doses muito acima das preconizadas na literatura, o que pode levar ao aumento dos níveis de resíduos de agroquímicos no produto final (GLIESSMAN, 2000; COSTA et al., 2012; BELCHIOR et al., 2014; GOULSON et al., 2015; PERSHINA et al., 2015; STUART; STUART; PIMENTEL, 2018; ESTEVE-TURRILLAS et al., 2018; CANG et al., 2018).

Entretanto, nos encontramos em um cenário de mudança na forma de pensar dos consumidores, os quais passam a buscar produtos mais saudáveis, sem conservantes químicos ou resíduos de fertilizantes químicos e agrotóxicos. Portanto, a busca por medidas de produção ambientalmente mais corretas e seguras do ponto de vista de saúde pública torna-se essencial quando se visa manter altas produtividades alcançadas e atingir novos mercados que não permanecem tão permeáveis a produtos com altos níveis de agrotóxicos e outros químicos, como antigamente.

Especificamente no caso de frutas de mesa que serão consumidas *in natura*, a contaminação das mesmas com resíduos de agrotóxicos e fertilizantes é um problema a ser abordado nos sistemas de produção agrícola tradicionais, sendo a segurança alimentar alvo de constante preocupação para a saúde pública (MATTOS, 2004; LI et al., 2011; OSHITA; JARDINS, 2012; CARVALHO, 2017; ESTEVE-TURRILLAS et al., 2018; CANG et al., 2018). Observa-se, portanto, que mudanças nas estratégias de produção são extremamente necessárias nesse contexto, sendo agricultores, extensionistas e pesquisadores desafiados a encontrar formas de manter ou melhorar o rendimento das culturas minimizando a degradação ambiental gerada e garantindo a segurança alimentar para o consumidor.

O termo desenvolvimento sustentável foi introduzido em 1987 pela Comissão Mundial de Meio Ambiente e Desenvolvimento da Organização das Nações Unidas (ONU) e pode ser compreendido como o desenvolvimento capaz de suprir as necessidades de uma geração sem comprometer a capacidade de atender às necessidades de gerações futuras. No contexto agrícola, é possível compreender o termo agricultura sustentável como a atividade agrícola

que se mantém por um longo período de tempo de forma economicamente viável, ambientalmente segura e socialmente justa (STRANGE; BAYLEY, 2008).

Em seu livro “Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável”, Altieri (2004), destaca os elementos básicos de uma estratégia agroecológica, sendo eles: conservação e regeneração de recursos naturais (controle da erosão e da fertilidade do solo e da saúde de plantas; captação, coleta, reserva *in situ* da água e manejo correto de irrigação; conservação de germoplasma local; uso de germoplasma adaptado aos ambientes; uso de flora e fauna benéficas, como inimigos naturais e polinizadores), manejo de recursos produtivos (diversificação temporal, como rotações de cultura; diversificação espacial, como policultivos, agroflorestas, sistemas mistos de plantio e sistemas agro-silvo-pastoris; diversificação genética, como o uso de multilinhas; regional, pelo zoneamento e trabalho em bacias hidrográficas; reciclagem de nutrientes e matéria orgânica, pelo uso de biomassa de plantas, biomassa animal e pela reutilização de recursos na propriedade rural; e regulação biótica, ou seja, controle biológico natural ou artificial) e implementação de elementos técnicos (definição de técnicas de regeneração, conservação e manejo de recursos adequados às necessidades do local e ao contexto agroecológico e socioeconômico; implementação de técnicas orientada por uma concepção holística ou integrada do todo; e incorporação de elementos do manejo tradicional de acordo com a racionalidade camponesa).

Nos últimos anos, em especial a partir da Instrução Normativa nº 007, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, publicada no Diário Oficial da União em 19/05/1999 (BRASIL, 1999) e da aprovação da Lei de Orgânicos nº10831 de dezembro de 2003 regulamentada pelo Decreto nº7048 de dezembro de 2009, tem sido observado um incentivo governamental para a produção ambientalmente segura, o que levou ao aumento da produção de orgânicos no país (BRASIL, 2007) e conseqüente busca por formas alternativas de manter a produtividade das culturas e de controle de pragas e doenças. Nesses sistemas de manejo ecológico da produção, são empregados conceitos que enfatizam o uso de relações biológicas entre os componentes do sistema, como controle biológico, fluxo de energia, ciclagem de nutrientes, utilização de recursos renováveis e disponíveis no local, funções e serviços ecossistêmicos relacionados ao aumento da biodiversidade, aproveitamento do microambiente, trofobiose e manejo da sucessão (GLEISSMAN, 2000).

Nesse contexto, o uso de produtos naturais, como extratos vegetais, biofertilizantes, própolis, óleos essenciais, preparados homeopáticos, óleos vegetais, preparados fúngicos ou bacterianos e bactérias promotoras de crescimento vegetal pode representar uma alternativa

viável, segura e ambientalmente correta ao sistema predominante de produção agrícola (GLEISSMAN, 2000).

2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

A diversidade de microrganismos é muito vasta, porém, grande parte dela ainda resta desconhecida. Estimativas apontam que em 1m² de solo, é possível encontrar uma densidade de 10¹⁴ células bacterianas, 10¹¹ células fúngicas e 10¹⁰ algas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Dados mais otimistas apontam que em 1g de solo é possível encontrar mais de 2x10⁹ células bacterianas em solos de floresta e mais de 1,5 x10⁹ células bacterianas em áreas onde é praticada a agricultura orgânica (PERSHINA et al., 2015). Estimativas sobre riqueza de espécies indicam que 1g de solo pode conter entre 5000 e 10000 espécies microbianas diferentes (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2007). No que tange a interação entre plantas e microrganismos, algumas estimativas sugerem que cerca de 20 mil espécies vegetais são totalmente dependentes de microrganismos simbiotes para a sobrevivência em ecossistemas terrestres (Van Der HEIJEN; BARDGETT; VAN STRAALLEN, 2008). Entretanto, em que se pese a diversidade das comunidades bacterianas associadas, é possível que exista um grande potencial desconhecido de uso biotecnológico desses microrganismos nunca antes explorado.

O solo apresenta grande concentração de bactérias, em especial na parte do solo localizada muito próximo às raízes (WHIPPS, 1990; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Essa região do solo é conhecida como rizosfera e é caracterizada por estar sob a influência direta dos exsudatos radiculares, constituindo assim, um ambiente bioquímico e ecológico diferente do restante do solo ao redor. A rizosfera contém uma grande variedade de compostos, entre eles, cita-se, em especial, os aminoácidos, os açúcares e os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas, além de mucilagem e fatores de crescimento, o que torna a região muito rica em nutrientes e, conseqüentemente, importante nos ciclos de nutrientes e na manutenção do estímulo do crescimento vegetal (BAIS et al., 2006; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; KAWASAKI et al., 2016). Conseqüentemente, também é observado atividade e crescimento microbianos intensos nessa região, isso porque os compostos orgânicos exsudados pelas raízes são utilizados como fonte de energia e nutrientes por esses microrganismos (KUZUYAKOV; CHENG, 2001; VALÉ et al., 2005; BAIS et al., 2006; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; OLANREWAJU et al., 2018). Além disso, estudos indicam que o ambiente rizosférico é responsável pelo aumento e pela modulação da diversidade microbiana associada às plantas, o que pode estar relacionado à interação de espécies microbianas com os

exsudatos liberados por cada espécie vegetal (HUGONI et al., 2018; OLANREWAJU et al., 2018), atração de determinadas espécies para a rizosfera devido ao padrão de exsudatos liberados (SCHULZ-BOHM et al., 2018) ou ainda à indução da mobilização de plasmídeos por exsudatos radiculares (ZHU et al., 2018). É importante ressaltar que esse efeito pode também contribuir para a passagem de características de promoção de crescimento vegetal, muitas vezes reguladas por genes presentes em elementos genéticos móveis (MARCHETTI et al., 2010; REMIGI et al., 2014).

Estudando a relação entre biomassa, concentração de carbono solúvel e não-solúvel na raiz, abundância de bactérias na rizosfera e atividade microbiana, Valé et al (2005) observaram variabilidade na atividade microbiana na rizosfera de 6 espécies vegetais e sugerem que a mesma seja controlada pela economia de carbono de cada espécie, sendo que plantas que liberam mais exsudatos aceleram a ciclagem de nutrientes através do estímulo da atividade microbiana.

Resultado similar foi observado por Kuziakov e Chen (2001) quando, estudando o efeito da submissão de plantas à diferentes fotoperíodos sobre a atividade microbiana (respiração). Nesse trabalho foi obtida alta relação entre a respiração microbiana do solo e o fotoperíodo ao qual cada planta foi submetida, evidenciando que a taxa de fotossíntese da planta é capaz de controlar a atividade microbiana na rizosfera.

Além disso, estudando a influência do perfil de exsudatos radiculares sobre a comunidade microbiana da rizosfera, Schulz-Bohm et al (2018) observaram que a migração de bactérias para a zona rizosférica pode ser estimulada e modulada pelo padrão de exsudatos voláteis liberados pelas plantas. Esse estudo constitui uma das primeiras evidências de que esses compostos podem difundir-se à longas distâncias, modulando de forma significativa as interações entre plantas e microrganismos presentes à longas distâncias da rizosfera. Nesse mesmo trabalho, foi observado que a exposição das plantas à fungos fitopatogênicos modificou o padrão de exsudatos radiculares voláteis e induziu à maior atração de bactérias que apresentam propriedades antifúngicas.

Resultado similar foi observado por Prabakaran et al (2017) em condições de laboratório, quando observaram que a interação entre plantas e fitopatógenos pode modificar a composição de exsudatos radiculares, por exemplo pelo maior acúmulo de momilactona A, em plantas de arroz infectadas.

Portanto, exsudatos radiculares são capazes de regular a comunidade microbiana do solo em suas proximidades, além de alterar propriedades químicas do solo, promover interações benéficas entre organismos e inibir espécies competidoras (BAIS et al., 2006; MOREIRA e

SIQUEIRA, 2006; HUGONI et al., 2018; ZHU et al., 2018; SCHULZ-BOHM et al., 2018). Nesse ambiente rizosférico, é possível observar condições muito favoráveis ao crescimento de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), quando comparado ao solo não rizosférico.

O termo bactéria promotora de crescimento em planta foi introduzido por Kloepper e Schroth em 1978 e agrupa bactérias não simbióticas presentes no solo, que colonizam raízes e tecidos vegetais e podem estimular o crescimento de plantas, além de serem capazes de multiplicar-se e competir com a microbiota autóctone. Mais tarde, passou-se a utilizar o termo para bactérias da rizosfera que podem crescer dentro, sobre ou em torno de tecidos vegetais e incitar o crescimento vegetal por múltiplos mecanismos (VESSEY, 2003). Enfim, bactérias promotoras de crescimento podem ser definidas como microrganismos benéficos às plantas, devido às interações harmônicas que realizam com as mesmas, podendo modular seu metabolismo e estimular a produtividade vegetal (PEREIRA et al., 2012; HERNANDEZ, 2015; BRUSAMARELLO-SANTOS, 2017).

A indução da resposta metabólica de planta por essas bactérias foi estudada por Brusamarello-Santos et al (2017) em milho com a inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* Fix⁺ e Fix⁻ em comparação com tratamento sem inoculação de bactérias. Nesse trabalho, os autores observaram mudança na presença e nas concentrações de uma grande gama de metabólitos vegetais entre os três tratamentos, sendo eles ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos. O padrão de resposta observado foi diferente entre tecidos da planta, evidenciando um padrão de acúmulo de metabólitos diferenciado quando na presença da bactéria. Esse mesmo trabalho evidenciou que bactérias Fix⁻ incapazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio, incitaram resposta metabólica da planta, destacando-se para o aumento dos níveis de manitol e trealose, carboidratos normalmente associados à respostas de defesa vegetal. Os autores sugerem que as bactérias promotoras de crescimento são capazes de induzir diferentes rotas metabólicas e diferentes respostas das plantas devido ao grande número de metabólitos química e fisiologicamente diferentes afetados pela inoculação.

Normalmente, esses microrganismos apresentam vida livre, mas podem se associar às raízes das plantas, compondo a comunidade microbiana das plantas enquanto epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; PEREIRA et al., 2012; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017). Esse grupo de bactérias constitui uma das alternativas potenciais para atingir a produção agrícola sustentável, apresentando mecanismos diretos e indiretos para a promoção do crescimento vegetal, além de serem nativos dos solos ou plantas a serem utilizados e, portanto, enquadrando-se na descrição de agricultura orgânica

e sustentável (Lei de Agricultura orgânica nº10831). Seu uso inclui tratamento de sementes, mudas micropropagadas, incorporação diretamente ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea (incluindo folhagem, flores e frutos), e em pós-colheita (FIGUEIREDO et al, 2010).

Os grupos bacterianos relatados como bactérias promotoras de crescimento de planta estão divididos nos filos Proteobacteria (em especial nas classes Alpha e Beta e Gammaproteobacteria), Actinobacteria e Firmicutes (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008).

Esse grupo de microrganismo pode desenvolver diversas atividades funcionais, entre elas: biofertilizantes (KHAWAS; ADACHI, 1999; GEORGE et al., 2013; HERNANDEZ, 2015; RODRIGUES et al., 2016; FELESTRINO et al., 2017; LINU et al., 2017; CARDINALE et al., 2018), fitoestimuladores (KHAWAS; ADAHI, 1999; BELIMOV et al., 2005; FENG et al., 2006; KOO; CHO, 2009; GALDIANO-JUNIOR, 2011; QUECINE et al., 2012; HERNANDEZ, 2015; FELESTRINO et al., 2017; TORRES et al., 2018; ZHAO et al., 2018), rizomediadores (aumentam a tolerância de plantas à contaminantes) (KOO; CHO, 2009) e biopesticidas (BESSION; HOURDOU; MICHEL, 1990; FERNANDO et al., 2005; QUECINE et al., 2012; GEORGE et al., 2013; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; RODRIGUES et al., 2016; FELESTRINO et al., 2017), além de estimularem a defesa vegetal (DU et al., 2016) e a tolerância à estresse ambiental, como baixa fertilidade de solos (ZAHEER et al., 2016) ou a seca (MISHRA et al., 2016).

Em geral, os principais efeitos observados em plantas após a inoculação dessas bactérias são aumento da taxa de germinação, modificações anatômicas em folhas e raízes, aumento de comprimento de raízes, crescimento de colmos e caules, aumento do número de folhas e da área foliar, aumento no conteúdo de clorofila das folhas, aumento do peso de frutos e melhora de sua textura e composição química, aumento do número de flores e do rendimento, maior sobrevivência de plantas na fase de aclimatização e modificações anatômicas, além de controlar a severidade e a incidência de fitopatógenos e aumentar a tolerância às condições ambientais de estresse (KHAWAS; ADACHI, 1999; BELIMOV et al., 2005; FENG et al., 2006; SALA et al., 2007; MENA-VIOLANTE; OLALDE-PORTUGAL, 2007; KOO; CHO, 2009; AHMED; HASNAIN, 2010; GALDIANO JUNIOR et al., 2011; ROJAS-TAPIAS; BONILLA, 2012; PEREIRA et al., 2012; LARRABURU; LLORENTE, 2015; MISHRA et al., 2016; ZAHEER et al., 2016; LINU et al., 2017; TODESCHINI et al., 2018).

À medida que as pesquisas avançam e a eficácia dessas bactérias no aumento da produtividade e crescimento vegetal é comprovada, novos produtos comerciais são formulados à base desses microrganismos em muitos países do mundo, como Estados Unidos,

Austrália e China (FIGUEIREDO et al., 2010). Sendo assim, a utilização de BPCPs pode potencialmente tornar-se uma das estratégias de maior importância para a agricultura mundial, estimulando e mantendo a produtividade das culturas a campo e diminuindo o impacto ambiental desses sistemas produtivos.

2.4 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal

As BPCPs podem promover o crescimento vegetal por meio de um ou vários mecanismos de ação, apesar de que na grande maioria das vezes um mesmo isolado apresenta mecanismos de promoção de crescimento combinados (PEREIRA et al., 2012; QUECINE et al., 2012; GEORGE et al., 2013; HERNANDEZ, 2015; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008) Esses mecanismos podem ser divididos em diretos e indiretos. Os mecanismos diretos envolvem a produção de substâncias promotoras de crescimento e aumento da disponibilidade de nutrientes às plantas e os indiretos estão mais relacionados à supressão de fitopatógenos na rizosfera ou ao estímulo da defesa vegetal (KHAWAS; ADACHI, 1999; VESSEY, 2003; FERNANDO et al., 2005; GEORGE et al., 2013; HERNANDEZ, 2015; JASIM et al., 2016; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; DU et al., 2016; FELESTRINO et al., 2017; TORRES et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

2.4.1 Mecanismos diretos de promoção de crescimento

2.4.1.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para os organismos vivos, juntamente com carbono e hidrogênio, participam na composição de moléculas de ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos, clorofila entre outras. As principais reações bioquímicas em plantas e microrganismos envolvem a presença do nitrogênio, tornando-o um dos elementos absorvidos em maiores quantidades pelas plantas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Assim, o nitrogênio é considerado um macronutriente, sendo necessário em grandes quantidades para as plantas. Entretanto, pode também ser considerado um nutriente limitante do crescimento vegetal, uma vez que a principal reserva do nutriente está na biosfera na forma molecular N_2 , uma forma quimicamente muito estável. Portanto, apesar de compor cerca de 78% da atmosfera, sua assimilação é limitada, requerendo a transformação para uma forma combinada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, os solos

brasileiros apresentam, em grande maioria, teores muito baixos de N disponível, o que torna indispensável o aporte de nitrogênio em grandes quantidades, geralmente realizado com fertilizantes químicos (DARTORA et al., 2013). No entanto, cabe citar os custos econômicos do uso desses produtos, haja vista que o Brasil importa 70% da uréia que utiliza (HUNGRIA et al., 2011), além dos custos ambientais relacionados à eutrofização de corpos d'água, salinização do solo e uso de recursos naturais não renováveis, como petróleo e gás natural (GLEISSMAN, 2000; OLIVEIRA et al., 2014).

Uma porção de organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera. Este processo é chamado fixação biológica do nitrogênio (FBN) e consiste na conversão do nitrogênio atmosférico em amônia, reação catalisada pela enzima nitrogenase que é encontrada em todos os organismos diazotróficos (TAIZ; ZEIGER, 2009; MARCHETTI et al., 2010). Dado à sua grande diversidade, esses microrganismos chamados de diazotróficos podem ser encontrados nos mais diversos habitats, em muitos tipos de solo, rizosfera e filosfera, além de águas doces e salgadas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A fixação biológica de nitrogênio é um processo altamente consumidor de energia, uma vez que a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio é muito forte. Assim sendo, o complexo enzimático nitrogenase deve consumir 16 moléculas de ATP por N_2 reduzido (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). É possível que a FBN realizada por diazotróficos endofíticos ofereça a vantagem de os microrganismos ocuparem espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro, o que permite maior e mais fácil acesso à fontes de carbono e menor competição com outros microrganismos por essas fontes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Apesar de os microrganismos diazotróficos se encontrarem em diferentes habitats, todos realizam a redução do N_2 por uma reação catalisada pela mesma enzima. Atualmente, sabe-se que a nitrogenase apresenta sistemas alternativos independentes geneticamente: nitrogenase 1 dependente de molibdênio (Mo) e ferro (Fe); nitrogenase 2, dependente de vanádio (V); e nitrogenase 3, dependente de ferro (Fe) (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Essa enzima é muito sensível ao oxigênio, perdendo sua conformação tridimensional irreversivelmente quando em contato com o elemento. Por esse motivo, muitos diazotróficos aeróbios desenvolveram mecanismos de proteção contra o oxigênio, além dos que são dependentes de ambientes microaerófilos para a fixação de nitrogênio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O processo de FBN pode contribuir com o fornecimento de nitrogênio ao solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). No Brasil, a eficiência da fixação biológica de nitrogênio no fornecimento do macronutriente para as plantas pode ser observada na cultura da soja,

onde 94 a 100% do N é fornecido de forma simbiótica, o que também auxiliou o país a estar entre os maiores produtores do grão (GRAHAM; VANCE, 2000; HUNGRIA et al., 2006).

Devido aos resultados iniciais positivos obtidos com a aplicação dessas bactérias em culturas de interesse agrícola, ocorreu um grande aumento no número de estudos relacionados à aplicação desses microrganismos na agricultura visando a menor dependência de fertilizantes nitrogenados e melhor aproveitamento do N atmosférico (GRAHAM; VANCE, 2000). Desde então, além do grupo mais estudado de diazotróficos, os rizóbios (bactérias nodulíferas que realizam simbiose fixadora de nitrogênio com leguminosas), outras espécies diazotróficas têm sido isoladas a partir de diferentes espécies vegetais.

Espécies pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* têm sido muito estudadas com relação à sua capacidade de FBN e têm sido observadas não apenas associadas à leguminosas ou a raízes, mas associadas à diferentes espécies vegetais e em tecidos como colmos, estolões ou livres no solo (QUECINE et al., 2012; PEREIRA et al., 2012; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017). Ensaio em planta indicam que essas espécies podem estimular um aumento de até 120% da biomassa vegetal (BALDANI; BALDANI; DOBEREINER, 2000).

Especialmente na cultura do morangueiro, trabalhos evidenciaram sua colonização por bactérias fixadoras de nitrogênio da espécie *Azospirillum brasilense* (PEDRAZA et al., 2007; GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012). Bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Azospirillum* e *Burkholderia* também têm apresentado potencial de promoção de crescimento de morangueiro (ANDRADE et al., 2019). Além disso, a inoculação de morangueiros com bactérias fixadoras do gênero *Rhizobium* sp. promoveu o aumento do conteúdo de antocianina, ácido cítrico, vitamina C e epicatequina em pseudofrutos (FLORES-FELIX et al., 2018). Ainda assim, novos trabalhos com o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em morangueiro podem agregar importantes informações sobre o potencial de uso de isolados bacterianos no cultivo dessas plantas, sobretudo visando-se a aplicação desses microrganismos em campos de produção de morango.

2.4.1.2 Solubilização de fosfato

Além do nitrogênio e do potássio, o fósforo também é considerado um macronutriente para plantas, sendo demandado em grandes quantidades para o bom funcionamento do metabolismo vegetal, entretanto, após o nitrogênio, o fósforo (P) é o macronutriente que mais limita o desenvolvimento dos vegetais. Esse nutriente é componente estrutural de

macromoléculas, como ácidos nucleicos e fosfolípidios, e também da adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento-chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas, como fotossíntese, armazenamento e transferência de energia, entre outros processos metabólicos (TAIZ; ZEIGER, 2009). O fato de o fósforo ser limitante para o crescimento das plantas não está relacionado às suas quantidades nos solos brasileiros, pois mesmo quando se encontra em abundância, em formas orgânicas e inorgânicas, encontra-se em baixa disponibilidade para as plantas, ou seja, passa de uma forma de P-lábil para P não lábil, processo ocasionado pela afinidade química entre o fósforo e íons de Ca^{2+} , Fe^{2+} e Al^{2+} (MALAVOLTA, 1980; RAIJ, 2004). Portanto, ainda que presente em grandes quantidades nos solos, o fósforo normalmente encontra-se em suas formas insolúveis, não disponíveis para as plantas. Além disso, essas formas são muito estáveis, de baixa reversibilidade e sua solubilidade só diminui com o passar do tempo (RAIJ, 2004).

Consequentemente, no cultivo de plantas de interesse agrícola, torna-se necessária a aplicação de fertilizantes fosfatados concentrados, sendo que apenas uma pequena porção do que é aplicado é realmente assimilado pelas plantas, enquanto a maior parte rapidamente forma os chamados “complexos insolúveis”. As conseqüências negativas do uso desses produtos podem ser observadas no ambiente e nos custos de produção agrícola, já que o 49% do fósforo utilizado na agricultura brasileira é advindo de importações (HUNGRIA et al., 2011).

Nas formas inorgânicas, o fósforo pode ser solubilizado pela atividade de raízes de plantas ou por microrganismos edáficos, sendo o principal mecanismo a liberação de ácidos orgânicos que promovem a acidificação do solo do ambiente ao redor. Essa possibilidade foi evidenciada por ensaios pioneiros de GERRETSEN (1948), nos quais microrganismos da rizosfera foram capazes de dissolver $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ e fosfato natural de Marrocos, o que levou à melhora da nutrição fosfatada de plantas de centeio, aveia, mostarda e girassol.

Nesse contexto, o uso de microrganismos solubilizadores de fosfato seria uma alternativa viável para a aplicação de fertilizantes fosfatados em áreas de cultivo (PUENTE.; LI; BASHAN, 2009; MARRA et al., 2011; MARRA et al., 2012; MARRA, 2012; LINU et al., 2017; SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; D’SOUZA, 2018; RAFI; KRISHNAVENI; CHARYULU, 2019).

Em geral, a capacidade de microrganismos em solubilizar fosfatos insolúveis tem sido atribuída à exsudação de ácidos orgânicos. Presume-se que esse mecanismo baseia-se na diminuição do pH do meio. O ácido glucônico, geralmente relacionado à solubilização de

fosfatos, pode apresentar a capacidade de solubilizar até 376µg/mL de fosfato tricálcico na concentração de 16,3mM (LIN et al., 2006).

Na maioria dos estudos com bactérias solubilizadoras de fosfato, o ácido glucônico é o mais observado (LINU et al., 2017). Porém, esses microrganismos podem produzir ainda os ácidos 2-cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, malônico, maléico, oxálico, propiônico, tartárico, butírico, cítrico, fumárico e succínico (TAHA et al., 1969; RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; LIN et al., 2006; JOHNSON e LOEPPERT, 2006; YI; HUANG; GE, 2008; PUENTE; LI; BASHAN, 2009; MARRA et al., 2012; SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018). Outra possível função dos ácidos orgânicos na solubilização de fosfatos seria a quelação de ácidos orgânicos. Ou seja, possivelmente esses ácidos orgânicos formam uma estrutura complexa com o elemento químico acompanhante do íon de fosfato. Nesse sentido, os ácidos cítrico e málico têm apresentado mais afinidade por metais trivalentes Fe^{3+} , sendo mais eficazes no processo de quelação e conseqüentemente na solubilização de fósforo (JOHNSON; LOEPPERT, 2006).

Além da exsudação de ácidos orgânicos, um segundo possível mecanismo dessas bactérias para a solubilização de fosfato seria a liberação de prótons H^+ resultante da assimilação de NH_4 e da atividade da enzima H^+ -ATPase durante a hidrólise do ATP, o que tem sido comprovado pela diferença de solubilização de fosfato em meios contendo NH_4^+ e NO_3^- (CANELLAS et al., 2006), sem exsudação de ácidos orgânicos (ILMER e SHINER, 1992). Em geral, nesses estudos, não foi observada correlação entre a quantidade de ácidos orgânicos liberados no meio de cultura e a quantidade de fosfato solubilizado, o que sugere que há um outro mecanismo além da exsudação de ácidos orgânicos para a solubilização de fósforo por bactérias.

Ainda existe um terceiro mecanismo utilizado pelas bactérias solubilizadoras de fosfato, a produção de exopolissacarídeos (SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018). Trabalhando com bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Arthrobacter* e *Azotobacter*, Yi, Huang e Ge (2008) observaram que os isolados que exsudaram grandes quantidades de exopolissacarídeos em meio de cultura também apresentaram maior capacidade de solubilizar fosfato tricálcico, ao contrário de isolados que não produziam exopolissacarídeos. Além disso, a adição de exopolissacarídeos em meio de cultura aumentou muito a capacidade de ácidos orgânicos em promover a solubilização de fosfato tricálcico, o que sugere um efeito sinérgico entre a atividade de ácidos orgânicos e de exopolissacarídeos.

Um possível quarto mecanismo de solubilização de fosfato por bactérias está relacionado à produção de sideróforos (peptídeos com alta afinidade por ferro). Em geral,

esses peptídeos são responsáveis por “seqüestrar” o ferro e, conseqüentemente, disponibilizar o fósforo (YU et al., 2011; HERNANDEZ, 2015).

Ainda é importante ressaltar que, à medida que disponibilizam fósforo insolúvel para as plantas pela quebra das ligações com íons de cálcio, ferro e alumínio, essas bactérias também estimulam a eficiência da FBN e potencializam a liberação de elementos-traço importantes para o crescimento vegetal.

2.4.1.3 Produção de ácido indol acético (auxinas)

Fitormônios podem ser descritos como compostos orgânicos e endógenos que, em baixas concentrações (menores do que 1 μM) promovem, inibem ou modificam processos morfológicos e fisiológicos vegetais, influenciando diretamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal (CASTRO; VIEIRA, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). Entre os cinco grupos de fitormônios conhecidos atualmente, as auxinas destacam-se atuando no desenvolvimento de raízes, na divisão celular, extensão e diferenciação celular, no estímulo da germinação de sementes, desenvolvimento de xilema em raízes, formação de raízes adventícias, tropismo, florescimento, frutificação, formação de pigmentos, biossíntese de metabólitos e resistência à fatores de estresse (TAIZ; ZEIGER, 2009). Esse grupo de fitormônios foi definido por Cleland (1995) como substâncias naturais e sintéticas que estimulam o alongamento em coleótilos e em segmentos de caule, tendo um espectro de atividade biológica semelhante, porém, não necessariamente idêntico àquele do ácido indolacético.

O triptofano é considerado molécula precursora para a síntese de auxinas, sendo convertida à ácido indolacético por diversas vias, a do ácido indol-purívico (IPA), a da triptamina (TAM) e a do ácido indol-acetonitrila (IAN). Algumas bactérias são capazes de sintetizar auxinas predominantemente pelas vias indol-3-acetamida (IAM) e IPA. Na via do IAM, o triptofano é transformado em IAM pela triptofano-2-monixigenase e o IAM é transformado em AIA pela atividade da enzima IAM hidrolase. Esse processo tem sido descrito em microrganismos dos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. A via do IPA inicia com a ação de uma aminotransferase que catalisa a reação de transaminação do triptofano, o qual é convertido à IPA e, em seguida, descarboxilado pela indol-3-piruvato descarboxilase a indol-3-acetaldeído, molécula que será posteriormente oxidada a ácido indolacético (AIA) pela indol-3-acetaldeído desidrogenase. Microrganismos dos gêneros *Pantoea*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*,

Enterobacter, e *Pseudomonas* produzem AIA por essa via (PATTEN; GLICK, 1996; TSAVKELOVA et al., 2006).

Muitas das espécies de microrganismos capazes de sintetizar auxinas interagem com plantas. Quando exsudadas por rizobactérias, as auxinas podem interferir em processos metabólicos e no crescimento das plantas, em especial ocasionando o crescimento de raízes e aumento do número de pêlos radiculares responsáveis pela absorção de água e nutrientes no solo, o que conseqüentemente mantém a planta melhor nutrida, levando à um crescimento vegetal mais acelerado e expressivo. Tem-se discutido a função da liberação de auxinas para as bactérias, sendo as mais aceitas relacionadas ao efeito das auxinas de promover a descamação de células da raiz e aumento da exsudação radicular, promovendo maior disponibilidade de compostos carbonados para as bactérias; e à detoxificação celular quando sob altos níveis de triptofano (GLICK, 2012).

Estudos com o uso de bactérias produtoras de auxina na cultura em morangueiro podem agregar importantes informações sobre o potencial de uso de isolados bacterianos no cultivo dessas plantas, sobretudo visando a seleção de bactérias que interagem diretamente com essa espécie vegetal e capazes de produzir o fitorrregulador.

2.4.1.4 Efeitos da aplicação de inoculação de BPCPs em espécies de interesse na agricultura

Estudos têm sido realizados visando à aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal na agricultura e os efeitos benéficos desses microrganismos sobre a produção vegetal têm sido descritos em culturas de interesse agrônômico.

Em milho, foi observado o aumento do comprimento de raízes em 248% e de parte aérea em 234% em relação ao controle após a inoculação com *Bacillus subtilis* (BATISTA, 2012). Nesse mesmo estudo, ainda ficou evidenciada a capacidade de bactérias do gênero *Burkholderia* em promover o crescimento dessa espécie vegetal. Ainda na mesma espécie vegetal, a inoculação de bactérias do gênero *Serratia* capaz de produzir ácido indol-acético e sideróforos, permitiu significativo crescimento de plantas sob condições de contaminação com cádmio, o que evidencia o potencial dessa bactéria em incitar a tolerância de plantas à solos contaminados (KOO; CHO, 2009). A capacidade de promover aumento da matéria seca vegetal e de raízes em milho também foi observada em bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter* e *Azospirillum* (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006). Rojas-Tapias e Bonilla (2012), trabalhando com isolados de *Azotobacter* em milho, observaram o aumento da

tolerância dessa espécie à salinidade após a inoculação das bactérias. Nesse estudo, foi observada a maior exclusão de sódio pelas plantas estimuladas pelas bactérias, aumento dos níveis de clorofila e diminuição dos níveis de prolina, relacionada à resposta das plantas ao estresse salino.

Em tomate inoculado com *B. subtilis*, foi observado um aumento de até 26% do peso seco de raízes, 15% da matéria seca de raízes, 25% da produtividade por planta e 20% de frutos comercializáveis, demonstrando que a inoculação dessa bactéria pode induzir a melhora da qualidade do produto final. Os frutos do tratamento com inoculação apresentaram-se maiores e mais pesados, além de apresentarem melhor textura dos frutos vermelhos (MENA-VIOLANTE; OLALDE-PORTUGAL, 2007). O tratamento de sementes de tomate foi avaliado por Hariprasad e Niranjana (2009). Nesse trabalho, a inoculação de sementes de tomate com bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Azotobacter* estimulou o aumento da taxa de germinação para 88% e o índice de vigor de sementes 1,522. Nesse mesmo trabalho, sementes não inoculadas apresentaram somente 70% de germinação e um índice de vigor de 0,859.

A colonização de tecidos de arroz por bactérias promotoras de crescimento tem sido descrita. Nessa espécie vegetal, a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* permitiu aumento de 30% do conteúdo de nitrogênio das plantas e maior incorporação de nitrogênio marcado ($^{15}\text{N}_2$) no tecido vegetal (FENG et al., 2006). Nessa mesma espécie vegetal, já foi relatado o aumento de até 64% na biomassa após a inoculação de bactérias do gênero *Pantoea* capazes de produzir ácido indol-acético, abscísico, giberelina, citocinina e de fixar nitrogênio. Além disso, essas bactérias demonstraram afetar a alocação de fotossintatos na planta (FENG et al., 2006). Bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Klebsiella* capazes de produzir auxinas também podem comprovadamente estimular alongamento de raiz de arroz, bem como o aumento da área radicular, da matéria seca de raízes e o desenvolvimento de raízes laterais e de pelos radiculares (KHAWAS; ADACHI, 1999).

Trabalhando com trigo, Mishra et al. (2016) observaram melhora da tolerância das plantas às condições de seca após a inoculação de bactérias dos gêneros *Flavobacterium* e *Enterobacter*, o que foi evidenciado pela melhora de parâmetros como integridade da membrana plasmática, acúmulo de sais e atenuação da expressão de genes relacionados ao estresse hídrico. Na mesma espécie vegetal, Sala et al (2007) observaram que a inoculação de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Achromobacter* e *Zoogloea* induziram o aumento da massa de matéria seca de plantas e do acúmulo de nitrogênio, bem como um aumento de até 45% na produtividade de grãos. Trabalhando com bactérias dos gêneros *Bacillus*,

Pseudomonas, *Escherichia* e *Micrococcus*, Ali, Sabri e Hasnain (2009) também observaram promoção de crescimento de trigo, em especial com o aumento do conteúdo de auxinas na planta, do tamanho de raízes (até 29%), número de perfilhos (até 97%) e peso de sementes (mais de 13%).

Em cana-de-açúcar, Quecine et al (2012) observaram aumento do peso de matéria seca de plantas 30 dias após a inoculação de bactérias do gênero *Pantoea* com capacidade de sintetizar ácido indol-acético e solubilizar fosfato. Rodrigues et al (2016), trabalhando com bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea* na mesma espécie vegetal, também observaram aumento da área foliar, e da matéria seca de plantas e de raiz, destacando-se o grande aumento da matéria seca de raiz (42% sob a inoculação de *Pantoea* e 58% sob a inoculação de *Klebsiella*).

Na espécie acumuladora de metais mostarda castanha (*Brassica juncea* L. Czern.) utilizada para biorremediação, a inoculação de bactérias do gênero *Flavobacterium*, *Variovorax* e *Rhodococcus* estimulou o alongamento das raízes na presença e na ausência de cádmio. Os isolados apresentaram a capacidade de produzir sideróforos e hidrolisar aminociclopropano carboxilato (possuem desaminase), precursor direto do etileno, o qual é responsável pela senescência de plantas (BELIMOV et al., 2005).

Uma das fases mais difíceis da propagação *in vitro* é a aclimatização. Em estudo com abacaxizeiro propagado *in vitro*, bactérias endofíticas também demonstraram eficiência para a promoção de crescimento e para o acúmulo de nutrientes na matéria vegetal (BALDOTTO et al., 2010).

Em batata, a inoculação com *Bacillus* promoveu aumento de até 40% no tamanho de plantas, bem como até 75% de aumento no tamanho de raízes, 67% de aumento no número de folhas, 100 a 130% de aumento no número de raízes, até 433% de aumento no conteúdo de auxina das plantas e até 82% no conteúdo de clorofila das folhas (AHMED; HASNAIN, 2010).

Em orquídeas, a inoculação de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* capazes de sintetizar ácido indol-acético induziu o crescimento de plantas propagadas *in vitro*, bem como a maior taxa de sobrevivência das mesmas durante a fase de aclimatização (GALDIANO-JUNIOR et al., 2011).

Em trabalhos com ervilhas, Oteino et al (2015) evidenciaram a eficácia de isolados de *Pseudomonas* capazes de solubilizar de 400 a 1300 mg/L de fosfato em promover o crescimento em substratos com baixos níveis do macronutriente na forma solúvel.

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal tem sido estudado em outras espécies de plantas. Concernente a cultura do morangueiro, trabalhos reportam a colonização dessa espécie vegetal por bactérias promotoras de crescimento em planta. Em 2007, Pedraza et al (2007) relataram pela primeira vez a ocorrência natural de *Azospirillum brasilense* em plantas de morango, colonizando raízes e tecidos de estolões. Nesse mesmo estudo, os isolados obtidos apresentaram a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e produção de fitormônios (especificamente componentes indólicos).

Guerrero-Molina, Winik e Pedraza (2012) também relataram a colonização de raízes de morangueiro por bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, em especial na zona de alongamento, no ápice da raiz e nos pelos radiculares. Em trabalho com inoculação de BPCPs em morangueiro, Pereira et al (2012) demonstraram que o morangueiro é naturalmente associado à uma grande variedade de microrganismos com capacidades fisiológicas e bioquímicas diversas comprovadas *in vitro*. O mesmo estudo evidenciou o maior crescimento de plantas após a inoculação de *B. subtilis*.

A inoculação de plantas de morangueiro com três estirpes de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. ocasionou aumento da biomassa de folhas e raízes de plantas, além do aumento da produção de flores e pseudofrutos e do conteúdo de ácido málico, de antocianina, compostos voláteis e elementos minerais dos pseudofrutos (TODESCHINI et al., 2018). Resultado similar foi observado por Flores-Felix et al (2018), quando a inoculação de morangueiros com bactérias do gênero *Rhizobium* sp. promoveu o aumento do conteúdo de antocianina, ácido cítrico, vitamina C e epicatequina em pseudofrutos; e por Andrade et al (2019), quando a inoculação com *Enterobacter*, *Burkholderia* e *Azospirillum* induziu o crescimento de morangueiro.

Ainda assim, novos trabalhos com o uso de BPCPs em morangueiro podem agregar importantes informações sobre o potencial de uso de isolados bacterianos no cultivo dessas plantas.

2.4.2 Mecanismos indiretos de promoção de crescimento

2.4.2.1 Controle biológico

O controle de patógenos e parasitas de plantas na agricultura atual ainda é realizado, em sua grande maioria, pela aplicação de agrotóxicos em altas quantidades, o que tem diversos impactos ambientais, além de aumentar o custo de produção de alimentos. Portanto, estudos

têm sido dedicados à busca por formas alternativas de controle de patógenos e parasitas de plantas.

O controle biológico pode ser aplicado na agricultura como uma forma alternativa de controle de fitopatógenos e parasitas vegetais. O controle biológico pode ser definido como a redução do inoculo ou de atividades determinantes de doença provocados por um patógeno ou parasita, nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizados naturalmente ou pela manipulação do hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas (BAKER; COOK, 1974).

Alguns microrganismos que interagem com plantas possuem capacidade de controle biológico de fitopatógenos, como *Pyricularia*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Botrytis* e *Penicillium* (LAVERMICOCCA et al., 2000; FERNANDO et al., 2005; VESPERMANN; KAI; PECHULLA, 2007; HARIPRASAD; NIRANJANA, 2009; MELO et al., 2009; YUAN et al., 2012; SINGH et al., 2012; TENORIO-SALGADO et al., 2013; GEORGE et al., 2015; AWLA et al., 2016; JASIM et al., 2016; VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018).

Em geral, esses microrganismos podem controlar fitopatógenos por diferentes mecanismos, os quais envolvem produção de β -1,3-glucanase, quitinase, celulase e pectinase (QUECINE et al., 2012; GEORGE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016), ácido cianídrico (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; RODRIGUES et al., 2016), além de antibióticos e outros metabólitos antifúngicos (BESSON; HOURDOU; MICHEL, 1990; NIELSEN et al., 2002; FERNANDO et al., 2005), sideróforos (BELIMOV et al., 2005; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; KOO; CHO, 2009; GEORGE et al., 2013; HERNANDEZ, 2015; FELESTRINO et al., 2017) e da indução da defesa vegetal (QUECINE et al., 2012; DU et al., 2016; VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018; ELIAS et al., 2018).

A abordagem metabolômica tem permitido a identificação e classificação de muitos compostos bacterianos antifúngicos (voláteis e não voláteis) nos mais diversos grupos químicos, como hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, alcoóis, lipopeptídeos (como surfactina e iturina), compostos aromáticos/benzenos, alquil, ácidos orgânicos, ésteres e éteres (FUJIMOTO, 2017; JASIM et al., 2016; GEORGE et al., 2015; YUAN et al., 2012; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2008; VESPERMANN; KAI; PECHULLA, 2007; FERNANDO et al., 2005). Devido ao potencial de aplicação desses organismos e dessas moléculas, os estudos de identificação de compostos antifúngicos e antibacterianos produzidos por bactérias promotoras de crescimento vegetal têm aumentado muito nos últimos anos.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem, ainda, influenciar na redução da incidência e severidade de doenças pelo estímulo da resposta de defesa vegetal. Du et al (2016), observaram mudanças no proteoma de plantas de pepino após a inoculação com *Paenibacillus polymyxa*. Entre as principais mudanças observadas nesse trabalho, cita-se o estímulo à síntese de proteínas relacionadas à estresse oxidativo (superóxido desmutase, peroxidase, ascorbato peroxidase), estímulo ao metabolismo energético (provavelmente para estímulo do crescimento vegetal e resistência ao patógeno), aumento da quantidade de aminoácidos expressos e estímulo à síntese de jasmonato, normalmente relacionado à resposta de defesa das plantas quando interagem com fitopatógenos. Os mesmos autores ainda observaram mudanças proteômicas relacionadas à aumento de tolerância das plantas à situações de estresse ambiental, como alta salinidade, altas temperaturas e estresse hipóxico.

O estímulo da resposta de defesa das plantas também foi evidenciado em experimentos de Quecine et al (2012), nos quais foi observada a síntese de enzimas quitinases e endoglucanases por tecidos radiculares de plantas após a inoculação com bactérias promotoras de crescimento, provavelmente relacionadas às enzimas hidrolíticas produzidas pelas bactérias no momento da infecção do tecido vegetal, as quais são reconhecidas pelas plantas e incitam a resposta de defesa.

Para que um microrganismo seja considerado um bom antagonista, deve apresentar estabilidade genética, eficácia em baixas concentrações, atuar contra uma grande gama de fitopatógenos, apresentar poucas exigências nutricionais, tolerância à condições de estresse ambiental, cultivo em meios baratos, não ser patogênico, não produzir metabólitos tóxicos para as plantas ou para seres humanos e apresentar compatibilidade com outros tipos de controle de fitopatógenos (SAPADARO e GULLINO, 2004).

Trabalhos evidenciam a capacidade antagonística de bactérias promotoras de crescimento contra microrganismos fitopatogênicos. Fernando et al (2005), observaram a capacidade de isolados de *Pseudomonas* em inibir o crescimento micelial e a germinação esclerodial de *Sclerotinia sclerotiorum* em 100%, além de inibir o a germinação de ascósporos em 88 a 90%. A inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos também foi demonstrada por Fujimoto (2017), trabalhando com bactérias do gênero *Bacillus*, onde se observaram 73% de inibição do crescimento micelial e 86% da incidência da doença mancha preta em citros. Jasim et al (2016) também confirmam a capacidade de bactérias promotoras de crescimento em controlar fitopatógenos. Nesse trabalho, o efeito destrutivo de metabólitos antifúngicos bacterianos sobre a morfologia de hifas do patógeno foi evidenciado a partir de observações microscópicas.

Estudos têm demonstrado a efetividade do uso de microrganismos endofíticos de plantas no controle a fitopatógenos de inúmeras espécies vegetais, como em colza e tomate (NEJAD e JOHSON, 2000), em algodão (CHEN et al., 1995), em pimenta (SOPHER; SUTTON, 2011), em controle pós-colheita framboesas (ANTONIOLLI et al., 2011), entre outros.

No que tange a cultura do morangueiro, a eficiência de bactérias do gênero *Bacillus* contra *B. cinerea* tem sido relatada (KIM et al., 2013). Trabalhos evidenciam que a exposição de plantas de morangueiro à compostos voláteis de bactérias da espécie *Bacillus methylotrophicus* ocasionou atraso na infecção de plantas por *B. cinerea*, aumento da deposição de calose nas folhas, bem como a diminuição do tamanho de lesões ocasionadas pelo fungo em pecíolos e diminuição do número de pecíolos necrosados em plantas (VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018). Além disso, a inibição de até 50% da incidência de mofo cinzento após a inoculação de bactérias das espécies *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *P. vesicularis* também foi relatada por Ilhan, Akgun e Karabulut (2013). Porém, ainda são poucos os estudos que visam a aplicação de bactérias que interagem com o morangueiro no controle pós-colheita de podridões do pseudofruto.

2.4.2.1.1. Mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.) em morango

O morangueiro é uma cultura muito susceptível ao desenvolvimento de fitopatógenos, em especial pelo cultivo em monocultura, má qualidade de mudas e ausência de cultivares comerciais resistentes. Sabe-se que o morangueiro pode ser afetado por 8 espécies de nematóides, 26 vírus diferentes, 3 espécies de bactérias e 51 espécies de fungos (MAAS, 1998).

Na cultura do morango, o período pós-colheita é um dos mais delicados, uma vez que a vida de prateleira da fruta é muito curta. Especificamente nessa fase, a principal patologia em morango é o mofo-cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.) (JANAKA, BETTI; KIMATI, 1997), que geralmente já se encontra na fruta de forma latente.

Essa doença é causada pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel e pertencente à família Sclerotiniaceae, o qual infecta aproximadamente 230 espécies vegetais diferentes (MAAS, 1998; JANAKA; BETTI; KIMATI, 1997). Os sintomas mais comuns estão relacionados à flores e frutos, mas podem ocasionar apodrecimento de brotos, tombamento e podridões em bulbos, colmos e raízes (JANAKA; BETTI, KIMATI, 1997). Esse fungo é saprofítico, podendo sobreviver em

matéria orgânica e em restos de culturas pela formação de esclerócios e micélio dormente (MAAS, 1998; JANAKA; BETTI; KIMATI, 1997).

Em pseudofrutos, como é o caso do morango, a doença inicia-se com o aparecimento de manchas marrons, que se expandem até tomar o pseudofruto o qual apresenta uma coloração acinzentada com o tempo, bem como a cobertura característica do mofo-cinzento (Figura 1). Após a infecção, a colonização é rápida, apresentando inicialmente uma coloração acinzentada e, posteriormente, cinza-amarronzada (JANAKA; BETTI; KIMATI, 1997).

Figura 1 - Evolução do fungo *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento, em morango



Fonte: Tofoli et al., 2011.

O fungo possui micélio com hifas ramificadas, septadas, de coloração marrom-acinzentado/oliva. Os conidióforos são marrons, ramificados no ápice, eretos, com conídios terminais agrupados no ápice. Os conídios são asseptados, de forma elipsóide e acinzentados (SANTOS et al., 2008).

O desenvolvimento do mofo-cinzento nas culturas está relacionado principalmente à temperaturas entre 18 e 25°C e umidade relativa entre 90 e 100% (MAAS, 1998; JANAKA; BETTI; KIMATI, 1997).

A podridão fúngica do fruto ou mofo cinzento pode destruir até 70% da produção de frutos, porém o mesmo patógeno infecta as plantas ainda no campo em folhas, caules, flores e frutos (FORTES, 2003), dada a importância da adoção de medidas que dificultem o desenvolvimento do fungo ainda no cultivo. Por ser um importante fitopatógeno de pós-colheita na produção de morango, o controle do mofo-cinzento é realizado pela aplicação de fungicidas.

No entanto, trabalhos apontam a eficácia de bactérias endofíticas de plantas no controle *in vitro* de *B. cinerea* (TOURÉ et al., 2004). Ainda que existam estudos sobre o controle em planta de mofo-cinzento em morango por bactérias que interagem com plantas (KIM et al.,

2013; ILHAN; AKGUN; KARABULUT, 2013; VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018) e por leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* (SANTOS et al., 2016) e *Rhodotorula glutinis* (ZHANG et al., 2007), ainda é necessária a avaliação da capacidade de isolados de bactérias endofíticas promotoras de crescimento em controlar o mofo-cinzeno *in vivo* e em pós-colheita, o que pode permitir a obtenção de isolados eficientes no controle da doença, sendo estes uma alternativa potencial à aplicação de fungicidas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.
- AHMED, A.; HASNAIN, S. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. **Pure Applied Chemistry**, v.82, n.1, p.313-319, 2010.
- ALEXANDRATOS, N; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050, ESA Working Paper, Agricultural Development Economics Division, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v. 12. n. 3, 2012.
- ALI, B. ; SABRI, K. ; HASNAIN, S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivus* L. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.542-547, 2009.
- ALTIERI, M. **Agroecologia** : a dinâmica produtiva da agricultura sustentável. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. 120p.
- ANTONIOLLI, L.R. **Boas práticas na cultura do morangueiro**. Porto Alegre: SEBRAE, 2007. 36p. (Boletim técnico).
- ANTUNES, L.E.C.; CARVALHO, A.M.S. **A cultura do morango**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 52p (Coleção Plantas, 68).
- ANTUNES, L.E.C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J.E. **Morangueiro**. Brasília: Embrapa, 2016. 573p (Documentos).
- ANTUNES, L.E.C.; REISSER JUNIOR, C. **Caracterização da produção de morangos no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2007. 13p (Documentos).
- AWLA, H.K.; KADIR, J.; OTHMAN, R.; RASHID, T.S.; WONG, M.Y. Bioactive compounds produced by *Streptomyces* sp. isolate UPMRS4 and antifungal activity against *Pyricularia oryzae*. **American Journal of Plant Sciences**, v.7, p.1077-1085, 2016.
- AZEVEDO, S.M.C. **Estudo de taxas de respiração e de factores de qualidade na conservação de morango fresco (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 2007. 225p. Dissertação (Mestrado em ciência do consumo alimentar) - Universidade Aberta, Porto, 2007.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plant and other organisms. **Annual Review in Plant Biology**. v, 57, p.233-266, 2006.
- BAKER, K.F. ; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco : W.H. FREEMAN, 1974. 433p.
- BALDANI, V.L. ; BALDANI, J.I. ; DOBEREINER, J. Inoculation of Rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.485-491, 2000.

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

BATISTA, B.D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. 2012. 129p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.

BELCHIOR, D.C.V.; SARAIVA, A.S.S.; LÓPEZ, A.M.C.; SCHEIDT, G.N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.34, n.1, p.135-151, 2014.

BELIMOV, A.A.; HONTZEAS, N.; SAFRONOVA, V.I.; DEMCHINSKAYA, S.V.; PILUZZA, G.; BULITTA, S.; GLICK, B.R. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.241-250, 2005.

BESSON, F.; HOURDOU, M.L.; MICHEL, G. Studies on the biosyntheses of iturin, an antibiotic of *Bacillus subtilis*, and a lipopeptide containing β -hydroxy fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1036, p.101-106, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva dos produtos orgânicos**. 2007. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/.../cadeia_produtiva_de_produtos_orgânico>. Acesso em 2 de fevereiro de 2018.

BRASIL. Instrução Normativa nº 007 de 17 de maio de 1999. Estabelece normas para a produção orgânica vegetal e animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de maio de 1999.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C. ; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.; SOUZA, E.M. ; LEA, P.J. ; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v.12, n.3. 2017.

CANG, T.; SUN, C.; ZHAO, H.; TANG, T.; ZHANG, C.; YU, R.; WANG, X.; WANG, Q.; DAI, F.; ZHAO, X. Residue behavior and risk assessment of imidacloprid applied on greenhouse-cultivated strawberries under different application conditions. **Environ Sci. Pollut. Res.**, v.25, p.5024-5032, 2018.

CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L.; FACANHA, A.R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺ - ATPases. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p.175-200.

CARDINALE, M.; SUAREZ.; STEFFENS, D.; RATERING, S. ; SCHNELL, S. Effect of different soil phosphate sources on the active bacterial microbiota is greater in the rhizosphere than in the endorhiza of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Microbial Ecology**, 2018.

CARVALHO, F.P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security**, v.6, n.2, p. 48-60, 2017.

CASTRO, P.R.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda, 2001, 132p.

CHANDLER, C.K.; FOLTA, K.; DALE, A.; WHITAKER, V.M.; HERRINGTON, M. Strawberry. In: BADENES, M.L.; BYRNE, D.H. **Fruit breeding, handbook of plant breeding**. Springer Science + Business Media, 2012.

CHEN, W.X. ; YAN, G.H. ; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, n.4, p.392-397. 1988.

CHEN, C. ; BAUSKE, E.M. ; MUSSON, G.M. ; RODRÍGUEZ-KABANA, R. ; KLOPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v.5, p.83-91, 1995.

CHEN, W.M. ; LAEVENS, S. ; LEE, T.M. ; COENYE, T. ; de VOS, P. ; MERGEAY, M. ; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp.nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1729-1735, 2001.

CLELAND, R.E. Auxin and cell elongation. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Acad. 1995, p.214-225.

COSTA, R. ; ROCHA, L.C.D. ; FREITAS, J.A. ; COURA JUNIOR, G.M.; SANTOS, O.M.; COUTO, E.O. Efeito de agrotóxicos usados na cultura do morangueiro sobre o predador *Phytoseiulus macropilis* (Banks) em laboratório, semicampo e campo no Sul de Minas Gerais. **Revista Agroambiental**, v.4, n.3, 2012.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V.F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.10, p.1023-1029, 2013.

DIAS, M.S.C. ; COSTA, H. **Morango: conquistando novas fronteiras**. In: Manejo de doenças do morangueiro. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 2007. 108p (Informe Agropecuário).

DOBEREINER, J. ; BALDANI, V.L.D. ; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In : FENDRIK, I. ; GALLO, M. ; VANDERLEYDEN, J. ; ZAMAROCZY, M. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Nato Asi Series, (series G : ecological sciences). Berlim: Ed Springer - Heidelberg, 1995, p.3-14.

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

DREYFUS, B. ; GARCIA, J.L. ; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov., sp.nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v.38, n.1, p.89-98, 1988.

DU, N. ; SHI, L. ; YUAN, Y. ; LI, B. ; SHU, S. ; SUN, J. ; GUO, S. Proteomic analysis reveals the positive roles of the plant-growth-promoting-rhizobacterium NSY50 in the response of cucumber roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* inoculation. **Frontiers in Plant Science**, v.7, 2016.

ELIAS, J.M.; GUERRERO-MOLINA, M.F.; MARTÍNEZ-ZAMORA, M.G.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Plant Biology**, v.20, n.3, 2018.

ESTEVE-TURRILLAS, F.A.; MERCADER, J.V.; AGULLÓ, C.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ABAD-FUENTES, A. Highly sensitive monoclonal antibody-based immunoassays for boscalid analysis in strawberries. **Food Chemistry**, 2017.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Statistics Division. Production quantities by country: Average 2016 – 2017. 2019. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em 21 jan. 2019

FELESTRINO, E.B. ; SANTIAGO,I.F ; FREITAS,L.S. ; ROSA,L.H. ; RIBEIRO, S.P. ; MOREIRA, L.M. Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaeae* rhizosphere host biological interface: a neglected model of bacterial prospectation. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 2017.

FENG,Y. ; SHEN,D. ; SONG, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, v.100,p. 938-945, 2006.

FERNANDO,W.G.D. ; RAMARATHNAM,R. ; KRISHNAMOORTHY,A.S.; SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.955-964, 2005.

FIGUEIREDO, M. B. V; SOBRAL, J. K.; STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M. Microrganismos promotores de crescimento de plantas: bactérias promotoras de crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. B. V. **Biotechnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Recife: Embrapa, 2010. p. 387-414.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura** : agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2013, 421p.

FLORES-FÉLIX, J. D.; VELÁZQUEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; SILVA, L. R.; RIVAS, R. *Rhizobium* and *Phyllobacterium* bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. **Food Research International**, 2018.

FORTES, J.F. **Morango**: produção. Brasília : Embrapa Clima temperado, 2003, 81p.

FUJIMOTO, A. **Identificação de compostos orgânicos voláteis e antibióticos produzidos por *Bacillus* spp. envolvidos no controle da mancha preta dos citros**. 2017. 74p. Tese (Doutorado em Microbiologia Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2017.

GALDIANO-JUNIOR, R.F.; PEDRINHO, E.A.N.; CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.729-737, 2011.

GALVÃO, A.G. **Hibridação de morangueiro e seleção de clones com potencial para cultivo no Sul de Minas Gerais**. 2014. 77p. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2014.

GARCIA, F.P. Fertilización del frésón. In: **El Fresón: Aspectos técnicos y perspectivas**. Valencia: Caia Rural. Cuadernos de Agricultura I, 1993. p.39-57.

GEORGE, P.; GUPTA, A.; GOPAL, M.; THOMAS, L.; THOMAS, G.V. Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF267 isolated from rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.109-117, 2013.

GEORGE, E.; KUMAR, S.N.; JACOB, J.; BOMMASANI, B.; LANKALAPALLI, R.S.; MORANG, P.; KUMAR, B.S.D. Characterization of the bioactive metabolites from a plant growth-promoting rhizobacteria and their exploitation as antimicrobial and plant growth-promoting agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.176, p.529-546, 2015.

GERRETSEN, F. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. **Plant and Soil**, v.1, n.1, 1948.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia** : processo ecológico em agricultura sustentável. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, 2000. 653p.

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

GRAHAM, P.H. ; VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective : an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65, p.93-106, 2000.

GUERRERO-MOLINA, M.F. ; WINIK, B.C. ; PEDRAZA, R..O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v.61, p.205-212, 2012.

GOULSON, D. ; NICHOLLS, E. ; BOTÍAS, C. ; ROTHERAY, E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides and lack of flowers. **Science**, v.347, n.6229, 2015.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65, p.93-106, 2000.

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

HERNÁNDEZ, A.G. **Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão**. 2015. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 1950. 347p (Documentos).

HUGONI, M.; LUIS, P.; GUYONNET, J.; HAICHAR, F. Z. Plant host habitat and root exudates shape fungal diversity. **Mycorrhiza**, v.28, p.451-463, 2018.

HUNGRIA,M.; FRANCHINI,J.C.; CAMPO,R.J.; CRISPINO,C.C.; MORAES,J.Z.; SIBALDELLI,R.N.R.; MENDES,I.C.; ARIHARA,J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, 2006.

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

ILHAN,K.; AKGUN,O.; KARABULUT,A. Efficacy and population monitoring of bacterial antagonists for gray mold (*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.) infecting strawberries. **Biocontrol**, v.58, n.4, p.457-470, 2013.

JANAKA, M.A.S. ; BETTI, J.A. ; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Ed. Ceres, 1997, 686p.

JARVIS,B.D.W. ; van BERKUM,P. ; CHEN, W.X. ; NOUR,S.M. ; FERNANDEZ,M.P. ; CLEYET-MAREL,J.C. ; GILLIS,M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huajuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, n.3, p. 895-898, 1997.

JASIM,B. ; BENNY,R. ; SABU,R. ; MATHEW,J.; RADHAKRISHNAN,E.K. Metabolite and mechanistic basis of antifungal property exhibited by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* BmB1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.179, p.830-845, 2016.

JOHSON, E. ; LOEPPERT,R.H. Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, p.222-234, 2006.

JORDAN,D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen.nov., a genus of slow-growing, root nodule from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, n.1, p.136-139, 1982.

JORDAN, D. Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. In : BALTIMORE, J.G. Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**. Williams and Wilkins, 1984. p. 234-256.

JOURAND, P. ; GIRAUD, E. ; BÉNA, G. ; SY,A. ; WILLEMS, A. ; GILLIS,M. ; DREYFUS, B. ; LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp.nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2269-2273, 2004.

KADER, A.A. Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry, p.145-152. In : DALE, A. ; LUBY, J.J. **The strawberry into the 21st**. Portland, Oregon: Timber Press, 1991. p.145-152.

KAWASAKI, A. ; DONN, S. ; RYAN, P.R. ; MATHESIUS, U. ; DEVILLA, R. ; JONES, A. ; WALT, M. Microbiome and exsudates of the root and rhizosphere of *Brachypodium distachyon*, a model for wheat. **Plos One**, v.11, n.10, 2016.

KHAWAS, H.E. ; ADACHI,K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.377-381, 1999.

- KIM, Y.S. ; SONG, J.G. ; LEE, I.K. ; YEO, W.H. ; YUN, B.S. *Bacillus* sp. BS061 suppresses powdery mildew and gray mold. **Microbiology**, v.41, n.2, p.108-111, 2013.
- KLOEPPER, J.W. ; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, v.71, p.642-644, 1981.
- KLOEPPER, J.W. ; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In : **Internacional conference on plant pathogenic bacteria**, 4, 1978. Angers : Institute National de la Recherche Agronomique, 1978, v.2, p.879-882.
- KOO, S.Y. ; CHO, K.S. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.11, p.1431-1438, 2009.
- KUMAR, G.K. ; RAM, M.R. Phosphate solubilizing rhizobia isolated from *Vigna trilobata*. **American Journal of Microbiological Research**, v.2, n.3, p.105-109, 2014.
- KUZYAKOV, Y. ; CHENG, W. Photosynthesis controls of rhizosphere respiration and organic matter decomposition. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.1915-1925, 2001.
- LAGES, J.A.P. ; CUNHA, M.L.S. ; LARA, M.T. **O morango e sua evolução comercial**. Minas Gerais: Ceasa Minas, 2006. 45p (Documentos).
- LAVERMICOCCA, P. ; VALERIO, F. ; EVIDENTE, A. ; LAZZARONI, S. ; CORSETTI, A. ; GOBBETTI, M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.9, p.4084-4090, 2000.
- LARRABURU, E. E. ; LLORENTE, B. E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in *in vitro* rooting of pink lapacho. **Plant Cell Tiss Cult**, v. 122, p. 175-184, 2015.
- LI, Y. ; CHEN, L. ; CHEN, Z. ; COEHLO, J. ; CUI, L. ; LIU, Y. ; LOPEZ, T. ; SANKARAN, G. ; VEGA, H. ; KRIEGER, R. Glove accumulation of pesticides residues for strawberry harvester exposure assessment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.86, p.615-620, 2011.
- LIN, T.F. ; HUANG, H.I. ; SHEN, F.T. ; YOUNG, C.C. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, v.97, p.957-960, 2006.
- LINU, M. S. ; ASOK, A. K. ; SREEKUMAR, J. ; JISHA, M. S. Mineral phosphate solubilization by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chilli (*Capsicum annum* L.) fields. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 55, n. 2, p. 134-144, 2017.
- MAAS, J.L. **Compendium of strawberry diseases**. Saint Paul: APS Press, 1998, 128p.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980, 251p.
- MARRA, L.M. ; OLIVEIRA, S.M. ; SOARES, C.R.F.S. ; MOREIRA, F.M.S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v.68, n.5, p.603-609, 2011.

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R.F.; LIMA, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bactéria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012.

MARRA, L.M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 2012. 141p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2012.

MARCHETTI, M.; CAPELA, D.; GLEW, M.; CRUVEILLER, S.; CHANE-WOON-MING, B.; GRIS, C.; TIMMERS, T.; POINSOT, V.; GILBERT, L.B.; HEEB, P.; MÉDIGUE, C.; BATUT, J.; MASSON-BOIVIN, C. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. **Plos Biology**, v.8, n.1, 2010.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v.51, p.326-335, 2006.

MELO, F.M.P.; FIORE, M.F.; MORAES, L.A.B.; SILVA-STENICO, M.E.; SCRAMIN, S.; TEIXEIRA, M.A.; MELO, I. S. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. **Scientia Agricola**, v.66, n.5, p.583-592, 2009.

MELO, F.M.P. **Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4A**. 2005. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

MENA-VIOLANTE, H.G.; OLALDE-PORTUGAL, V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. **Scientia Horticulturae**, v.113, p.103-106, 2007.

MISHRA, G.; SAPRE, S.; SHARMA, A.; TWARI, S. Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Biology**, v.18, n.6, p.992-1000, 2016.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, 2ed. Lavras: Editora UFLA, 2006, 729p.

MATTOS, M.L.T. Segurança alimentar: o caso do morango. 2º Simpósio Nacional do Morango – 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas, 2004, Pelotas. **Anais do 2º Simpósio Nacional do Morango**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004.

NEJAD, P.; JOHNSON, A. Endophytic bactéria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. **Biological Control**, v.18, p.208-215, 2000.

NIELSEN, T.H.; SORENSEN, D.; TOBIASEN, C.; ANDERSEN, J.B.; CHRISTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M.; SORENSEN, J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. From the sugar beet rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3416-3423, 2002.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011

- OLANREWAJU, O.S.; AYANGBENRO, A.S.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.
- OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SCIVITTARO, W.B. Mudas certificadas de morangueiro: a maior produção e melhor qualidade da fruta. **A lavoura**, Rio de Janeiro, v.108, n.55, 2005.
- OLIVEIRA, A.L.M.; COSTAS, K.R.; FERREIRA, C.; MILLANI, M.L.; SANTOS, O.J.A.P.; SILVA, M.B.; ZULUAGA, M.Y.A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, n.1, p.56-77, 2014.
- OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p.52-76, 2012.
- OTEINO, N.; LALLY, R.D.; KIWANUKA, S.; LLOYD, A.; RYAN, D.; GERMAINE, K.J. ; DOWLING, D.N. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 2015.
- PASSOS, F.A. **Influência de sistemas de cultivo na cultura do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 1997. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.
- PEDRAZA, R.O.; MOTOK, J.; TORTORA, M.L.; SALAZAR, S.M.; DÍAZ-RICCI, J.C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant and Soil**, v.29, p.169-178, 2007.
- PEREIRA, G.V.M.; MAGALHÃES, K.T.; LORENZENTII, E.R.; SOUZA, T.P.; SCHWAN, R.F. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v.63, p.405-417, 2012.
- PERSHINA, E.; VALKONEN, J.; KURKI, P.; IVANOVA, E.; CHIRAK, E.; KORVIGO, I.; PROVOROV, N.; ANDRONOV, E. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. **Plos One**, v.10, n.12, 2015.
- PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p.389-401, 2009.
- PRABAKARAN, M.; KIM, S.H.; OH, Y.T.; RAJ, V.; CHUNG, I.M. Anticorrosion properties of momilactone A isolated from rice hulls. **J. Ind. Eng. Chem**, v.45, p.380-386, 2017.
- QUECINE, M.C. ; ARAUJO, W.L. ; ROSSETTO, P.B. ; FERREIRA, A. ; TSUI, S.; LACAVA, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.21, p. 7511-7518, 2012.
- RAFI, M.M.; KRISHNAVENI, M.S.; CHARYULU, P.B.B.N. Phosphate-solubilizing microorganisms and their emerging role in sustainable agriculture. In: BUDOLLA, V. **Recent developments in applied microbiology and biochemistry**. Coreia do Sul: Academic Press, 2019. p. 223-233.

- RAIJ, B.V. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ADBALLA, S.R.S. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 107-115.
- REMIGI, P.; CAPELA, D.; CLERISSI, C.; TASSE, L.; TORCHET, R.; BOUCHEZ, O. ; BATUT, J. ; CRUVEILLER, S. ; ROCHA, E.P.C. ; MASSON-BOIVIN, C. Transient hypermutagenesis accelerates the evolution of legume endosymbionts following horizontal gene transfer. **Plos Biology**, v.12, n.9, 2014.
- RIVAS, R. ; VELÁZQUEZ, E. ; WILLEMS, A. ; VIZCAÍNO, N.; SUBBA-RAO, N.S.; MATEOS, P.F.; GILLIS, M.; DAZZO, F.B. ; MARTÍNEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing-root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.11, p.5217-5222, 2002.
- RODRIGUES, A.A. ; FORZANI, M.V. ; SOARES, R.S. ; SIBOV, S.T. ; VIEIRA, J.D.G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.2, p.149-158, 2016.
- RODRIGUEZ-DÍAZ, M. ; RODELAS-GONZÁLEZ, B. ; POZO-CLEMENTE, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. A review on the taxonomy and possible screening traits of plant growth promoting rhizobacteria. In : AHMAD, J.P. ; HAYAT, S. **Plant-bacteria interactions** : strategies and techniques to promote plant growth. Verlag: Wiley VCH, 2008, p.55-80.
- RODRIGUEZ, H. ; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.
- ROJAS-TAPIAS, D. ; BONILLA, R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, v.61, p.264-272, 2012.
- SALA, V.M.R. ; CARDOSO, E.J.B.N. ; FREITAS, J.G. ; SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.833-842, 2007.
- SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M.. **Morango**: produção. Embrapa, 2003. 81p (Documentos).
- SANTOS, P.E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2790-2798, 2001.
- SANTOS, D.A.; OLIVEIRA, D.F.; TONIAL, I.B.; YAMAGUCHI, M.M.; COELHO, A.R. Controle biológico em morangos in natura. In: OLIVEIRA, A.F.; STORTO, L.J. **Tópicos em ciência e tecnologia de alimentos**: resultados de pesquisas acadêmicas. Ed. Blucher, 2016.
- SANTOS, A.F. Ocorrência do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em grevilea. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.5, p.368-387, 2008.
- SANTOS, A.M. **Melhoramento genético do morangueiro**. Belo Horizonte: Epamig, 1999. 29p (Informe Agropecuário).

- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. The last word : books as a statistical metaphor for microbial communities. **Annual Review in Microbiology**, v.61, p.23-34, 2007.
- SCHULZ-BOHM, K.; GERARDS, S.; HUNDSCHIED, M.; MELENHORST, J.; BOER, W.; GARBEVA, P. Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles. **The ISME Journal**, 2017.
- SILVA, A.F.; DIAS, M.S.C.; MARO, L.A.C. **Botânica e fisiologia do morangueiro**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. 13p (Informe Agropecuário).
- SINGH, A.; MAURYA, S.; SINGH, R.; SINGH, U.P. Antibiotic potential of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) against *Sclerotium rolfsii*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.45, n.14, 1655-1662, 2012.
- SONG, O.R.; LEE, S.J.; LEE, Y.S.; LEE, S.C.; KIM, K.K.; CHOI, Y.L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.151-156, 2008.
- SOPHER, C.R.; SUTTON, J.C. Quantitative relationships of *Pseudomonas chlororaphis* 63-28 to *Pythium* root rot and growth in hydroponic peppers. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.4, p.214-224, 2011.
- SPADARO, D.; GULLINO, M.L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruits diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 185-194, 2004.
- SHRIVASTAVA, M.; SHRIVASTAVA, P.C.; D'SOUZA, S.F. Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. In: MEENA, V.S. **Role of rhizospheric microbes in soil**. Singapura: Springer. 2018, p.137-165.
- STRANGE, T.; BAYLEY, A. Sustainable development: linking economy, society and environment. **OECD Insights**, 2008. 146p.
- STUART, A.K.C.; STUART, R. M.; PIMENTEL, I.C. Effect of agrochemicals on endophytic fungi community associated with crops of organic and conventional soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Agriculture and Natural Resources**, v.52, p.388-392, 2018.
- TAHA, S.M.; MAHMOUD, S.A.Z.; EL-DAMATY, A.H.; EL-HAFEZ, A.B.D. Activity of phosphate-dissolving bacteria in egyptian soils. **Plant and Soil**, n.1, 1969.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p
- TENORIO-SALGADO, S.; TINOCO, R.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; PEREZ-RUEDA, E. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. **Bioengineered**, v.44, p.236-243, 2013.
- TODESCHINI, V.; AITLAHMIDI, N.; MAZZUCCO, E.; MARSANO, F.; GOSETTI, F.; ROBOTTI, E.; BONA, E.; MASSA, N.; BONNEAU, L.; MARENGO, E.; WIPF, D.; BERTA, G.; LINGUA, G. Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality and volatiles. **Frontiers in Plant Science**. v. 9, p.1-22, 2018.
- TORRES, D.; BENAVIDEZ, I.; DONADIO, F.; MONGIARDINI, E.; ROSAS, S.; ^{SPAEPEN}, S.; VANDERLEYDEN, J.; PENCIK, A.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; FRÉBORTOVÁ, J.;

- CASSÁN, F. New insights into auxin metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. **Research in Microbiology**, 2018.
- TOURÉ, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, P.; GUIRO, A.; THONART, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.1151-1160, 2004.
- TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, n.2, p.117-126, 2006.
- VALÉ, M.; NGUYEN, C.; DAMBRINE, E.; DUPOUEY, J.L. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.2329-2333, 2005.
- VAN DE HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALLEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v.11, p.296-310, 2008.
- VESPERMANN, A.; KAI, M.; PIECHULLA, B. Rhizobial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.17, p.5639-5641, 2007.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.
- VICENTE-HERNÁNDEZ, A.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; VALENCIA-CANTERO, E.; RAMÍREZ-ORDORICA, A.; HERNÁNDEZ-GARCIA, A.; GARCÍA-JUÁREZ, P.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Aromas') plants in vitro and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction. **Journal of Plant Growth Regulation**, 2018.
- WANG, S.Y.; CAMP, M.J. Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. **Scientia Horticulturae**, v.85, p.183-199, 2000.
- WANG, H.; YAN, Y.; WANG, J.; ZHANG, H.; QI, W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. **Plos One**, v.7, n.1, 2012.
- WHIPPS, J. Carbon utilization. In: LYNCH, J.M. **The rhizosphere**. Chichester: Wiley-interscience, 1990. p.59-97.
- YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1059-1065, 2008.
- YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v.47, p.138-145, 2011.
- YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.16, p.5942-5944, 2012.

ZAHHEER, A. ; MIRZA, B.S. ; McLEAN, J.E.; YASMIN, S.; SHAH, T.M. ; MALIK, K.A. ; MIRZA, M.S. Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. **Research in Microbiology**, v.167, n.6, p.510-520, 2016.

ZHANG, H. ; WANG, L. ; JIANG, Y.D.S. ; CAO, J. ; MENG, R. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. **Biological Control**, v.40, p.287-292, 2007.

ZHANG, T. ; SHI, Z.Q. ; HU, L.B. ; CHENG, L.G. ; WANG, F. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.783-788, 2008.

ZHAO, C.Z. ; HUANG, J. ; GANESHWAR, P.; ZHAO, D. *Rhizobium* sp. IRBG74 alters *Arabidopsis* root development by affecting auxin signaling. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 2018.

ZHU, H.; ZHANG, L.; LI, S.; WANG, Y. ; SUN, S. ; CHEN, J.; KOU, S.; JIN, Q.; XIAO, M. The rhizosphere and root exudates of maize seedlings drive plasmid mobilization in soil. **Applied Soil Ecology**, 2018.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MORANGUEIRO

RESUMO

O morango (*Fragaria x ananassa*, Duch.) é uma cultura importante no mundo todo. Especificamente no Brasil, sua produção é realizada majoritariamente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Entretanto, por ser uma cultura extremamente exigente em condições químicas do substrato, grande parte da produção nacional de morango implica na aplicação de grandes quantidades de fertilizantes nos campos de produção. Essa prática pode causar problemas de ordem ambiental e de saúde pública, além de aumentar razoavelmente os custos de produção da fruta. Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal em campos de produção pode ser uma importante estratégia, sobretudo por sua habilidade de estimular o crescimento de plantas via diferentes mecanismos. Portanto, objetivou-se com esse estudo testar *in vitro* e *in vivo* o potencial de promoção direta de crescimento de bactérias isoladas a partir de folhas e raízes de morangueiro. Os isolados foram testados *in vitro* quanto à capacidade de produzir auxinas, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio biologicamente. Isolados selecionados *in vitro* foram testados em plantas de morango quanto à sua capacidade de promover crescimento vegetal e aumentar o acúmulo de nitrogênio e fósforo foliares. Os isolados testados apresentaram efeito sobre o crescimento vegetal de acordo com parâmetros biométricos. Entre os isolados testados, resultados mais expressivos para as variáveis estudadas foram observados com a inoculação do isolado MET12M2. De modo geral, a inoculação de bactérias induziu efeitos estirpe-dependentes no crescimento de morangueiro. Ensaios *in vitro* e *in vivo* evidenciam o potencial de uso do isolado MET12M2 como promotor de crescimento para morango.

PALAVRAS-CHAVE: Interação planta-bactéria; rizobactérias; bactéria endofítica; fixação biológica de nitrogênio; auxina; solubilização de fosfato.

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch.) is an important crop worldwide. Specifically in Brazil, its production is mainly carried out in the states of Minas Gerais, São Paulo and Rio Grande do Sul. However, being a demanding crop, many of the national strawberry production implies the application of large amounts of fertilizers in the productive fields. This practice can cause environmental and public health problems, as well as reasonably increase production costs. In this context, using plant growth-promoting bacteria in production fields can be an important strategy, especially due their ability to stimulate plant growth through different mechanisms. Therefore, the aim of this study was to test in vitro and in vivo the potential for direct growth-promotion of bacteria isolated from strawberry leaves and roots. The isolates were tested in vitro for their ability to produce auxins, to solubilize phosphate and to fix nitrogen biologically. Selected isolates were tested in strawberry plants for their ability to promote plant growth and to increase the foliar nitrogen and phosphorus accumulation. All isolates had an effect on plant growth according to biometric parameters. Among them, more significant results were observed after inoculation of the MET12M2 isolate. Bacteria induced strain-dependent effects on strawberry growth. In vitro and in vivo assays demonstrate the potential of using the MET12M2 isolate as a growth-promoter for strawberry.

KEYWORDS: Plant-bacteria interaction; rhizobacteria; endophytic bacteria; biological nitrogen fixation; auxin; phosphate solubilization.

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa*, Duch.) é uma espécie resultante do cruzamento entre as espécies nativas *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*, pertence à família Rosaceae (FILGUEIRA, 2013) e seu (pseudo) fruto é apreciado no mundo todo por suas características organolépticas e nutraceuticas (TACO, 2011; COELHO JUNIOR, 2016). Dados da FAO indicam que a produção mundial dessa fruta ultrapassa 9 milhões de toneladas, em uma área cultivada próxima a 400 mil hectares, sendo a mesma dispersa em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (FAO, 2019).

Porém, muitos dos resultados de produção e produtividade têm sido alcançados através de sistemas intensivos, sobretudo com a utilização de fertilizantes químicos altamente solúveis, uma vez que o morango é uma cultura extremamente demandante em termos de fertilidade química do solo (SBCS, 2004).

Como consequência, impactos sobre o ambiente, assim como o aumento do custo de produção de alimentos têm sido observados (GLIESSMAN, 2000). Além disso, estimativas indicam um crescimento de 35% da população mundial até o ano de 2050, o que exigirá um aumento de 60% da produção agrícola em relação à produção atual e, conseqüentemente, maior intensificação dos sistemas produtivos (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012; HUNTER et al., 2017; YANG et al., 2018).

Mudanças nas estratégias de produção são necessárias nesse cenário, destacando-se a busca por formas de cultivo ambientalmente corretas, seguras do ponto de vista de saúde pública e viáveis do ponto de vista econômico.

Em sistemas de manejo ecológico da produção, são empregados conceitos que enfatizam o uso de relações biológicas entre seus componentes, sendo de suma importância o sistema solo-planta. Nesse contexto, destacam-se as relações desenvolvidas na rizosfera, uma zona localizada na interface entre raiz e solo que se encontra sob influência direta de exsudatos radiculares, o que também a torna uma zona de intensa atividade, concentração e diversidade microbiana (VALÉ et al., 2005; BAIS et al., 2005; OLANREWAJU et al., 2018; HUGONI et al., 2018; SCHULZ-BOHM et al., 2018).

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem ser definidas como microrganismos presentes na rizosfera e capazes de desenvolver interações harmônicas com as plantas, podendo modular seu metabolismo e estimular a produtividade vegetal (KLOEPPER; SCHROTH, 1978; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017).

Esse grupo de microrganismos pode desenvolver atividades funcionais com potencial para a aplicação na agricultura visando a promoção direta de crescimento, entre elas: biofertilizantes (FELESTRINO et al., 2017; LINU et al., 2017; CARDINALE et al., 2018), fitoestimuladores (QUECINE et al., 2012; FELESTRINO et al., 2017 TORRES et al., 2018; ZHAO et al., 2018) e rizomediadores (aumentam a tolerância de plantas à contaminantes) (KOO; CHO, 2009), além de estimularem a tolerância à estresse ambiental, como baixa fertilidade de solos (ZAHEER et al., 2016) ou a seca (MISHRA et al., 2016).

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal tem sido estudado na cultura do morangueiro. A colonização de raízes de morangueiro por *Azospirillum brasilense* já tem sido relatada (PEDRAZA et al., 2007; GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012; ANDRADE et al., 2019). Em trabalho com inoculação de BPCPs em morangueiro, Pereira et al (2012) demonstraram que o morangueiro é naturalmente associado à uma grande variedade de microrganismos com capacidades fisiológicas e bioquímicas diversas comprovadas *in vitro*. Além disso, estudos têm evidenciado eficiente promoção de crescimento de morangueiro após inoculação com BPCP (PEREIRA et al., 2012; TODESCHINI et al., 2018; FLORES-FELIX et al., 2018; VICENTE-HERNANDEZ et al., 2018; MORAIS et al., 2019; ANDRADE et al., 2019). Ainda assim, novos trabalhos com o uso de BPCPs em morangueiro podem agregar importantes informações sobre o potencial de uso de isolados bacterianos na promoção de crescimento dessa espécie vegetal.

Tendo por base o contexto apresentado, objetivou-se com esse trabalho avaliar o potencial de promoção direta de crescimento de bactérias isoladas de folhas e raízes de morangueiro *in vitro* e *in vivo* na mesma espécie vegetal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e cultivo dos isolados

Bactérias utilizadas neste trabalho foram obtidas em isolamento prévio a partir de folhas e raízes de morangueiro da cultivar Aromas, como descrito por Andrade (2017).

Os isolados bacterianos foram reativados em meio ágar-nutriente (3g L⁻¹ de extrato de carne, 5g L⁻¹ de peptona, 15g L⁻¹ de ágar). Para os testes de produção de auxinas e para a produção de inoculantes, os isolados foram cultivados em meio caldo nutriente (3g L⁻¹ de extrato de carne, 5g L⁻¹ de peptona).

Visando à avaliação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio, os isolados foram cultivados em meio NFb (5gL^{-1} de ácido málico, $0,5\text{gL}^{-1}$ de K_2HPO_4 , $0,2\text{gL}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,1\text{gL}^{-1}$ de NaCl , $0,02\text{gL}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1mL de solução de vitaminas, 2 mL de solução de micronutrientes, 4mL de FeEDTA a 1,64%, 2 mL de solução de azul de bromotimol, $4,5\text{gL}^{-1}$ de KOH e $1,8\text{gL}^{-1}$ de ágar) modificado pela adição de 5gL^{-1} de sacarose. Para a produção desse meio, a solução de vitaminas foi composta por 10mg de biotina e 20mg de piridoxol-HCl em 100mL de solução; a solução de micronutrientes foi composta por 0,2g de $\text{Ca}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,235g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,28g de H_3BO_3 , 0,008g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,024g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 200mL de solução e a solução de azul de bromotimol foi obtida a 0,5% em 0,2N de KOH (DOBEREINER, 1991).

Para avaliações da capacidade de solubilização de fosfato e cálcio, os microrganismos foram cultivados em meio NBRIP (10gL^{-1} de glicose, 5gL^{-1} de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5gL^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0,25\text{gL}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,2\text{gL}^{-1}$ de KCl , $0,1\text{gL}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NAUTIYAL, 1999), ao qual foram adicionados 15gL^{-1} de ágar.

Em todos os testes, os isolados foram mantidos a 30°C para o crescimento, sendo que, quando cultivados em meio líquido, foram mantidos sob agitação constante de 120rpm em shaker sob as mesmas condições citadas acima.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6,8 a 7, quando necessário, com solução 1 mol L^{-1} de HCl ou NaOH e, em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2 Avaliação *in vitro* da capacidade de promoção de crescimento vegetal.

2.2.1 Teste de fixação biológica de nitrogênio

A capacidade de fixação biológica assimbiótica de nitrogênio dos isolados foi confirmada a partir da metodologia proposta por Dobereiner (1991). Com essa finalidade, os isolados foram cultivados em meio nitrogen-free bromothymol blue (NFb) modificado pela adição de 5gL^{-1} de sacarose com pH ajustado para 6,8 a 7,0.

Os isolados bacterianos foram previamente ativados em meio de cultura ágar-nutriente por 48 horas a 30°C . Em seguida, foram repicados em profundidade no meio de cultura NFb modificado semi-sólido.

Os frascos foram incubados em BOD a 30°C e a avaliação foi realizada todos os dias após a inoculação por até 10 dias. Isolados foram considerados capazes de fixar nitrogênio

biologicamente quando observada a formação de halo ou película aerotóxica típica próxima à superfície do meio de cultura, indicando que há redução do nitrogênio atmosférico em amônia. Como controle positivo para esse teste, foi utilizada a estirpe Ab-V5 *Azospirillum brasiliense* e todas as análises foram realizadas em triplicata para cada isolado, sendo um tubo considerado uma repetição.

2.2.2 Teste de produção de auxinas

A capacidade dos isolados bacterianos em produzir ácido indol-acético foi confirmada pelo método colorimétrico Salkowski (GORDON; WEBER, 1951; LOACES; FERRANDO, SCAVINO, 2011). Para tanto, os isolados foram cultivados em meio caldo nutriente com pH ajustado para 6,8 a 7,0 e incubados a 30°C durante 48 horas sob agitação constante de 120rpm. Após esse período, a concentração de células bacterianas foi ajustada para 1×10^8 células/mL em espectrofotômetro (densidade óptica de 0,5 em comprimento de onda de 600nm, com base na escala de Mc Farland).

Posteriormente, foram transferidos 10% (v/v) da cultura bacteriana para tubos de ensaio contendo 4,5mL de meio caldo nutriente suplementado com triptofano (100µg/mL). Os tubos foram incubados em BOD a 30°C por 72 horas no escuro sob agitação constante de 120rpm. Após esse período, a cultura bacteriana foi submetida à centrifugação a 12000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado. A produção de auxina foi determinada pela mistura de 1mL do sobrenadante recuperado, com 1mL do Reagente de Salkowski (1,875g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 150mL de H_2SO_4 a 35% e 100mL de água). Em seguida, a mistura foi incubada em BOD a 30°C por 15 minutos no escuro. Após a incubação da mistura, realizou-se a medida de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm. A quantificação da produção de auxina foi realizada por comparação à uma curva padrão obtida a partir de solução de AIA (ácido indol acético) nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12, 18,21 e 24µg/mL. A coloração rósea-avermelhada das amostras foi considerada indicativo de produção de auxina. Para essa avaliação, foi utilizada a estirpe Ab-V5 *Azospirillum brasiliense* como controle positivo e todas as análises foram realizadas em triplicata para cada isolado, sendo um tubo considerado uma repetição.

2.2.3 Teste de solubilização de fosfato de cálcio

A avaliação da capacidade de solubilização de fosfato dos isolados foi realizada a partir da metodologia proposta por Nautiyal (1999).

Inicialmente, os isolados foram cultivados em meio caldo nutriente com pH 6,8 a 7,0 sob agitação constante de 120rpm a 30°C por 48 horas. Após esse período, foi ajustada a densidade óptica à um comprimento de onda de 600nm para um valor igual a 0,5 (equivalente a 1×10^8 células/mL, de acordo com a escala de Mc Farland). Uma alíquota de 10 μ L da suspensão bacteriana foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura NBRIP em 3 pontos equidistantes na placa. O material foi incubado a 30°C e a avaliação foi realizada de 3 em 3 dias até o 12º dia após o cultivo.

Os isolados foram considerados capazes de solubilizar fosfato inorgânico e insolúvel quando observada a presença de um halo translúcido em torno das colônias (área circundante translúcida, área de solubilização). O diâmetro do halo translúcido foi mensurado e, no 12º dia, foi calculado o índice de solubilização de fosfato por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976; AKINTOKUN et al., 200). Com base nos índices de solubilização (IS), os isolados foram classificados em isolados de baixa capacidade de solubilização de P ($IS < 2,00$), isolados de intermediária capacidade de solubilização de P ($2,00 < IS < 4,00$) e isolados de alta capacidade de solubilização de P ($IS > 4,00$). A bactéria da espécie *Azospirillum brasilense* foi utilizada como controle positivo para esse teste e as avaliações foram realizadas em triplicata, com uma placa de Petri sendo considerada uma repetição.

2.3 Avaliação da promoção de crescimento em mudas de morango

Cinco isolados selecionados nos testes de promoção direta de crescimento *in vitro* foram avaliados quanto a sua capacidade de promoção de crescimento vegetal em morangueiro a partir de dois diferentes ensaios conduzidos em casa de vegetação sob delineamento inteiramente casualizado (com 10 repetições/vasos contendo uma muda por tratamento).

Para esses ensaios, cada isolado foi considerado um tratamento, além dos tratamentos controle com 30% de nitrogênio e fósforo + sem inoculação de bactéria, com solução nutritiva completa e controle com a inoculação de *Azospirillum brasilense*. Em ambos os ensaios, mudas de morango da cultivar Aromas obtidas em cultura de tecidos foram cultivadas em

substrato inerte composto de areia e vermiculita na proporção 1:1 (v:v). Além disso, foi adicionado fosfato natural de Argélia com 29% de P_2O_5 e solubilidade igual a 2% em ácido cítrico ao substrato em todos os tratamentos. Para tanto, o fosfato foi calculado para o fornecimento de 260kg/ha de P_2O_5 (SBCS, 2004). O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 1 hora por três vezes, com 24 horas de diferença entre cada esterilização.

As mudas foram mantidas em vasos de volume igual a 5L de substrato e irrigadas a cada 2 dias com água destilada autoclavada. Além disso, a cada 5 dias foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (completa para o controle positivo e com 30% de nitrogênio e fósforo para os tratamentos com inoculação dos isolados bacterianos e controle negativo). A solução completa de Hoagland e Arnon (1950) utilizada para o tratamento sem inoculação + adubação completa foi composta de 1mLL⁻¹ de KH_2PO_4 (1mol/L), 5mLL⁻¹ KNO_3 (1mol/L), 5mLL⁻¹ de $Ca(NO_3)_2$ (1mol/L), 2mLL⁻¹ de $MgSO_4$ (1mol/L), 1mL de solução de micronutrientes (2,86gL⁻¹ de H_3BO_3 , 1,81gL⁻¹ $MnCl_2$, 0,22gL⁻¹ de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,08 gL⁻¹ de $NaMoO_4 \cdot 4H_2O$) e 1mL de Fe-EDTA (24, 1gL⁻¹ de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 25,1gL⁻¹ de EDTA). A composição da solução com reduzida adição de nitrogênio e fósforo (30% da composição total da solução) consistiu na substituição de KH_2PO_4 , KNO_3 e $Ca(NO_3)_2$ por 5,7 mLL⁻¹ de KCl (1mol/L), 5mLL⁻¹ de $CaCl_2$ (1mol/L), 0,3 mLL⁻¹ de KH_2PO_4 (1mol/L) e 3mLL⁻¹ de NH_4NO_3 (1,5mol/L) (HERNÁNDEZ, 2015).

O inóculo bacteriano foi previamente preparado pelo cultivo dos isolados selecionados nos testes *in vitro* de promoção de crescimento em meio caldo nutriente a 30°C sob agitação constante de 120 rpm durante 48 horas e posterior ajuste da concentração celular para 1×10^8 células/mL (densidade óptica de 0,5 a um comprimento de onda de 600nm mensurada em espectrofotômetro, de acordo com a escala de Mc Farland).

As mudas de morango foram avaliadas quanto às suas características de crescimento, cinco meses após a instalação do experimento. As características avaliadas foram comprimento de raiz, massa seca de raiz e de parte aérea (após acondicionamento do material em estufa de circulação forçada a 60°C até que o peso estabilize), massa seca total, número de folíolos, área foliar e análises de teor de nitrogênio e fósforo foliar (EMBRAPA, 2009).

2.3.1 Análise de área foliar

Após a coleta de folhas, três delas por indivíduo foram scanneadas. Em seguida, obteve-se a medida da área foliar considerando seu contorno com auxílio do software ImageJ.

2.3.2 Quantificação do teor de N foliar

Ao final de 4 meses, foi quantificado o teor de nitrogênio foliar das plantas submetidas à tratamentos com adubação reduzida + sem inoculação, com adubação e com inoculação dos isolados selecionados.

Para a determinação do teor de nitrogênio foliar, todas as amostras foram digeridas pelo método $H_2SO_4+H_2O_2$ e, em seguida, destiladas utilizando-se o método Kjeldahl, como descrito pela Embrapa (2009). O conteúdo de nitrogênio acumulado nas plantas foi calculado pela multiplicação da concentração do elemento pelo respectivo peso de matéria seca.

2.3.3 Quantificação do teor de P foliar

Ao final do experimento de avaliação da promoção de crescimento vegetal *in vivo*, foi quantificado o teor de fósforo foliar das plantas.

O material vegetal coletado foi submetido à digestão $H_2SO_4 + H_2O_2$ e, em seguida, a determinação do teor de fósforo total foliar foi realizada pelo método de espectrofotometria com azul-de-molibdênio, como descrito pela Embrapa (2009).

O teor de fósforo foliar total foi obtido pela comparação das medidas de absorvância das amostras em uma curva padrão produzida a partir da medida da absorvância das soluções-padrão com concentrações de fósforo conhecidas.

O conteúdo de fósforo acumulado nas folhas foi calculado pela multiplicação da concentração do elemento pelo respectivo peso de matéria seca de parte aérea.

2.4 Análise estatística

Resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas no software R (R Core Team, 2019) pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Com a finalidade de selecionar bactérias a partir de testes de promoção de crescimento *in vitro*, análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando-se a média de três repetições para cada uma das variáveis (solubilização de fosfato e produção de auxina). Para tanto, vetores e autovalores estimados foram obtidos para cada componente principal (CP) de uma matriz de correlação. Os scores de cada isolado foram calculados a partir dos autovetores do primeiro CP. Os isolados bacterianos com as maiores pontuações foram utilizados para

testes posteriores *in vivo*. A análise foi realizada com ambiente de computação estatística R (R Core Team 2019).

Todos os gráficos foram produzidos com o software SigmaPlot 13.0 (Systat Software, Inc).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de auxinas

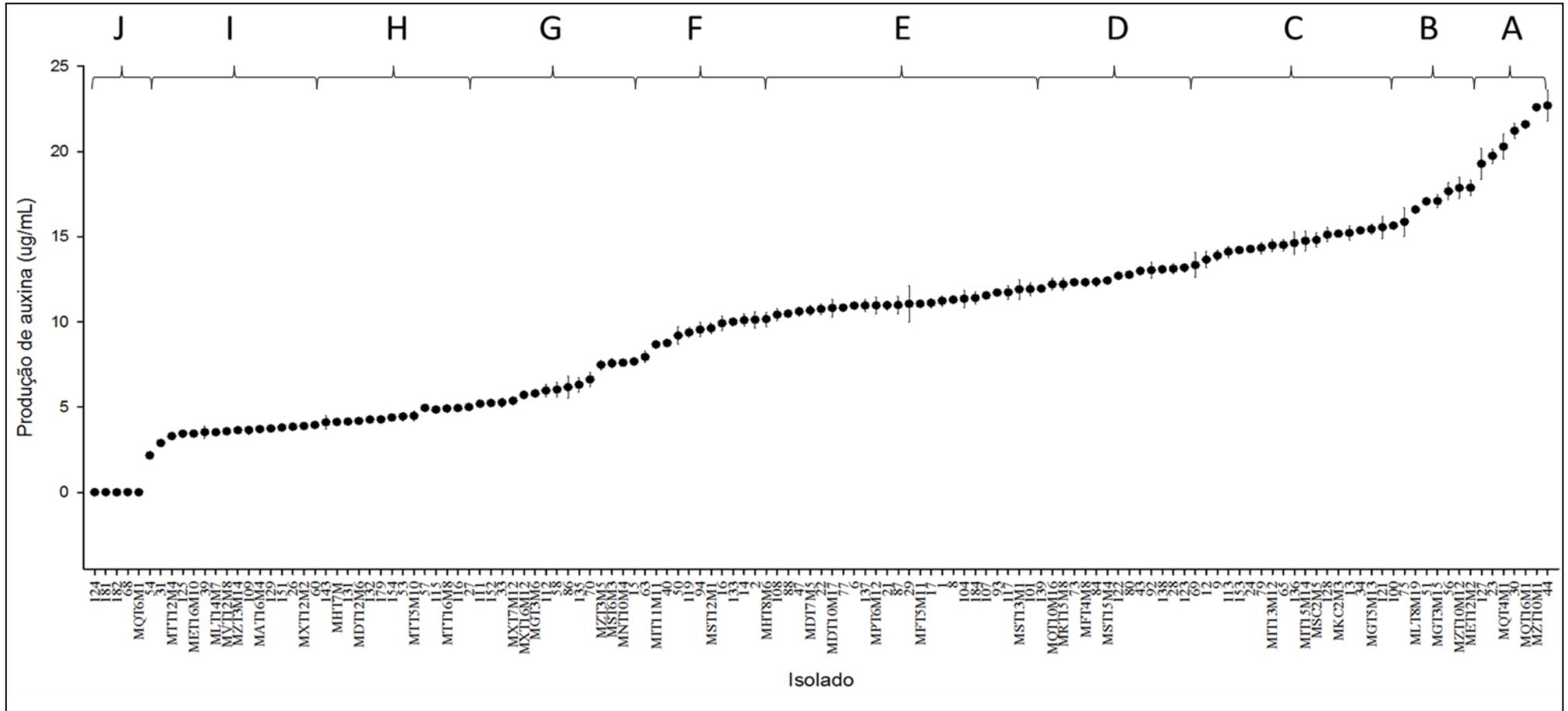
Resultados obtidos em testes de produção *in vitro* de auxinas evidenciam a capacidade dos isolados bacterianos em produzir esse fitormônio (Figura 1). De todos os isolados, 130 apresentaram algum nível de produção do fitorregulador. Observou-se grande variação na produção desse metabolito entre os isolados, sendo que os valores obtidos variaram entre 0 (para os isolados 124, 181, 182, 68 e MQT6M1) e 23 μ g/mL (para o isolado 44). Os maiores valores de produção de auxinas foram observados nos tratamentos com os isolados 44, MZT10M1, MQT16M1, 30, MQT4M1, 23 e MET12M2 (Figura 1).

De modo geral, a produção de auxina pode variar em quantidade entre isolados bacterianos e dependendo de condições de cultivo, já tendo sido descritas produções muito elevadas do fitorregulador por diferentes isolados bacterianos. Avaliando a promoção de crescimento de alface por estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, Schindwein et al (2008) observaram a produção de até 171,2 μ g/mL de AIA. Entretanto, a produção de auxina em níveis muito altos pode ter efeito de inibição do crescimento vegetal (SCHLINDWEIN et al., 2008; SHAH et al., 2017).

Em ensaios com isolados pertencentes aos gêneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Paenibacillus* e *Chryseobacterium*, Verma et al (2017) observaram produções de auxinas que variaram entre 6,6 (*Chryseobacterium* sp) e 47,06 μ g/mL (*Pantoea hericii*). Os autores relataram que a inoculação com ambas as estirpes, maior produtora e menor produtora de auxina, induziram o aumento do comprimento das raízes e a formação de pêlos radiculares. O mesmo foi observado em ensaios com diferentes isolados do gênero *Bacillus*, para os quais se observou produção de 1,36 a 19,42 μ g/mL de auxina (PEREIRA et al., 2012).

Especificamente em morango, isolados dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter* e *Burkholderia* que produziram de 0,3870 a 5 μ g/mL foram capazes de promover crescimento dessa espécie vegetal (DIAS et al., 2009; ANDRADE et al., 2019).

Figura 1 - Produção de auxina por bactérias endofíticas de morangueiro



Entretanto, essas concentrações são variáveis em função da capacidade do isolado bacteriano (SHAH et al., 2017; ANDRADE et al., 2019) condições de cultivo, presença do substrato e fase de crescimento do microrganismo, pH, presença de ácidos orgânicos, metais (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010; CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014; SPAEPEN, 2015) e presença do precursor triptofano (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008).

Durante a interação com plantas, exsudatos radiculares permitem a suplementação em triptofano na rizosfera, o qual pode ser utilizado por microrganismos para a síntese de auxina (KRAVCHENCO et al., 2004; KAMILOVA et al., 2006). Da mesma forma, microrganismos da rizosfera são capazes de estimular a exsudação de triptofano pelas plantas, além de aumentar a expressão de genes relacionados a transporte e síntese de triptofano nas mesmas (LIU et al., 2016).

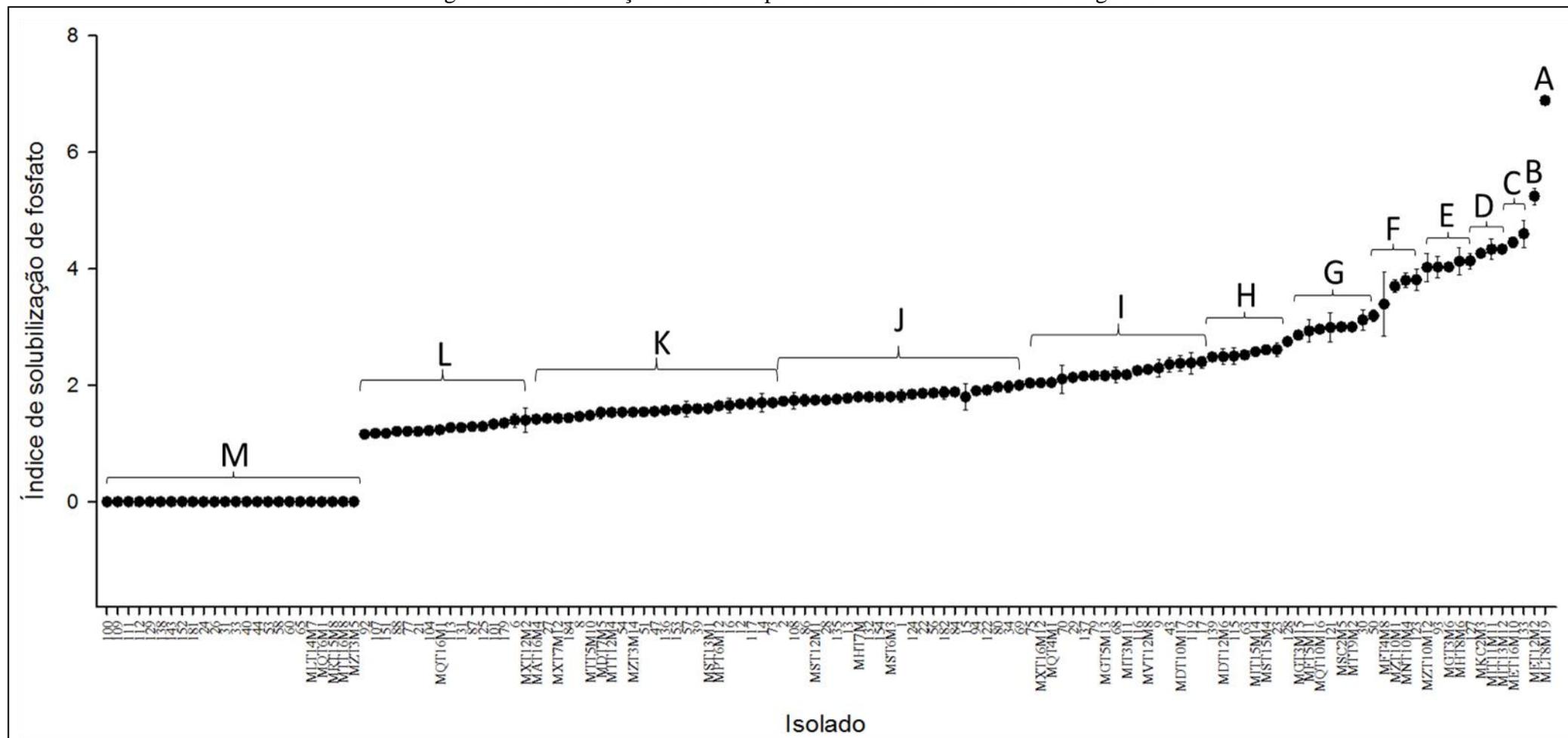
3.2 Solubilização de fosfato

Resultados obtidos em testes *in vitro* de solubilização de fosfato evidenciam a capacidade dos isolados bacterianos em realizar essa atividade (Figura 2). Observou-se grande variação na solubilização desse elemento em meio de cultura entre os isolados, sendo que os valores de índice de solubilização de fosfato encontrados variaram entre 0 e 7 (para o isolado MLT8M19). Os maiores índices de solubilização de fosfato foram observados nos tratamentos com os isolados MLT8M19, MET12M2, MET16M10, MIT13M12 e MKC2M3 (Figura 2).

Bactérias de diferentes gêneros têm sido descritas como solubilizadoras de fosfato, entre eles *Acinetobacter*, *Paenibacillus*, *Rhizobium* (MARRA et al., 2012), *Pseudomonas* e *Enterobacter* (SULEMAN et al., 2018). Entretanto, a capacidade e a eficiência na solubilização de fosfato por bactérias aparenta ser isolado-dependente (SULEMAN et al., 2018; MARRA et al., 2019).

A capacidade de solubilização de fosfato em bactérias tem sido explicada pela produção de diferentes ácidos orgânicos (YI; HUANG; GE, 2008; PUENTE; LI; BASHAN, 2009; MARRA et al., 2012; SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018), sendo o ácido glucônico o mais observado (LINU et al., 2017; SULEMAN et al., 2018).

Figura 2 - Solubilização de fosfato por bactérias endofíticas de morangueiro



O tipo de ácido produzido por cada espécie tem sido reportado como um importante fator para a eficiência de solubilização dos isolados, sendo que a produção simultânea de diferentes ácidos pode aumentar a capacidade de determinado isolado em solubilizar o nutriente (MARRA et al., 2012; MARRA et al., 2019)

No entanto, bactérias também podem solubilizar o nutriente pela liberação de prótons H^+ resultante da assimilação de NH_4 e da atividade da enzima H^+ -ATPase durante a hidrólise do ATP (ILMER; SHINER, 1992; CANELLAS et al., 2006), produção de exopolissacarídeos (YI; HUANG; GE, 2008; SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018) e síntese de peptídeos que apresentam alta afinidade por ferro chamados de sideróforos (YU et al., 2011; HERNANDEZ, 2015).

Em geral, mesmo em solos que apresentam grandes quantidades de fósforo, em formas orgânicas e inorgânicas, o mesmo encontra-se em baixa disponibilidade para as plantas, processo ocasionado pela afinidade química entre o fósforo e íons de Ca^{2+} , Fe^{2+} e Al^{2+} (MALAVOLTA, 1980; RAIJ, 2004). Portanto, o fósforo normalmente encontra-se em suas formas insolúveis, não disponíveis para as plantas. Além disso, essas formas são muito estáveis, de baixa reversibilidade e sua solubilidade só diminui com o passar do tempo (RAIJ, 2004). Assim, o uso de microrganismos solubilizadores de fósforo pode potencialmente tornar-se uma importante estratégia para a agricultura.

3.3 Fixação biológica de nitrogênio

Concernente à fixação assimbiótica de nitrogênio, apenas 59 isolados foram capazes de realizá-la, sendo estes pertencentes a diversos gêneros, como *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*. No entanto, a avaliação desse teste é qualitativa, não permitindo inferências em termos de quantidade (Tabela 1).

Muitas espécies têm sido descritas como fixadoras de nitrogênio, sendo as mesmas distribuídas em muitos grupos filogenéticos de Bacteria (incluindo bactérias verdes sulfurosas, Firmicutes, Actinobacteria, cianobactéria e todas as subdivisões de Proteobacteria) e Archea (DIXON e KAHN, 2004; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; MASSON-BOIVIN et al., 2009).

Genes simbióticos relacionados à fixação biológica de nitrogênio podem estar localizados em plasmídeos ou cromossomos (MASSON-BOIVIN et al., 2009; MARCHETTI et al., 2010; MARCHETTI et al., 2014). A localização dos genes simbióticos em plasmídeos

(componentes genéticos móveis) pode ter grande influência para a observação dessa característica em diferentes grupos microbianos. De fato, estima-se que a transferência horizontal dos genes simbióticos desempenha um papel muito importante na passagem desses genes entre microrganismos. Essa transferência horizontal de genes pode ser ocasionada por eventos de conjugação de plasmídeos simbióticos (RAMSAY et al., 2006; MARCHETTI et al., 2010; DAUBECH et al., 2017; CAPELA et al., 2017) e pode ter ocasionado a passagem desses genes entre espécies.

Tabela 1 - Fixação assimbiótica de nitrogênio por bactérias endofíticas de morangueiro. Teste qualitativo.

| Isolado | FBN | Isolado | FBN | Isolado | FBN | Isolado | FBN | Isolado | FBN |
|----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|-----|---------|-----|
| 60 | - | 139 | - | 135 | - | 80 | - | 43 | - |
| MQT10M16 | + | 56 | + | MZT3M14 | - | MHT7M | - | 88 | - |
| MLT14M7 | - | MKC2M3 | ++ | 115 | + | 184 | - | 101 | - |
| MLT14M7 | - | MHT8M6 | + | 70 | ++ | 16 | - | 51 | - |
| 63 | - | MNT10M4 | - | 117 | ++ | 111 | - | 100 | - |
| MFT4M8 | - | MZT10M1 | + | 77 | ++ | 137 | - | 138 | - |
| 28 | - | 53 | + | 87 | - | 123 | - | MZT3M5 | - |
| 40 | - | 125 | + | MQT6M1 | - | MVT12M8 | - | 132 | - |
| MZT10M12 | + | 68 | - | 122 | ++ | MXT7M12 | ++ | 27 | ++ |
| 108 | - | 128 | - | 33 | + | 30 | - | 29 | - |
| 8 | + | 17 | + | MLT8M19 | ++ | 116 | + | 152 | - |
| 24 | + | MET12M2 | ++ | 57 | + | 94 | ++ | 44 | - |
| 9 | + | MGT5M13 | ++ | MTT9M2 | - | 179 | - | 26 | ++ |
| 13 | + | 92 | ++ | 104 | - | MTT12M4 | - | 133 | - |
| MST12M1 | + | 39 | ++ | 75 | - | MIT13M12 | - | MXT12M2 | ++ |
| 1 | - | 6 | - | MTT16M8 | ++ | 86 | + | 127 | + |
| 50 | - | 34 | ++ | 14 | - | MRT15M8 | - | 182 | - |
| 22 | - | 119 | + | 129 | - | MTT12M4 | - | 181 | - |
| MST6M3 | + | 84 | ++ | 21 | - | MQT4M1 | - | | |
| MSC2M5 | + | 112 | + | MQT16M1 | - | 124 | - | | |
| MDT12M6 | - | 93 | + | MET16M10 | ++ | 143 | - | | |
| MDT7M5 | + | 12 | - | MIT3M11 | ++ | 73 | ++ | | |
| 47 | - | 2 | + | 79 | - | 136 | - | | |
| MST15M4 | + | MTT5M10 | ++ | 109 | ++ | MXT16M12 | - | | |
| MDT10M17 | + | MIT15M14 | ++ | MGT3M15 | + | MGT3M6 | - | | |
| MIT11M11 | + | 107 | - | 69 | - | 54 | - | | |
| MFT5M11 | + | 69 | - | 107 | - | MST13M1 | - | | |
| 31 | + | 131 | - | 121 | ++ | 15 | - | | |
| 23 | - | 151 | ++ | MAT16M4 | - | 57 | - | | |
| 154 | - | 58 | + | MPT6M12 | - | 113 | - | | |

Símbolos observados são referentes à classificação dos isolados quanto à espessura da película aerotóxica formada em meio NFb: - = sem formação de halo; + = halo de baixa espessura (1mm); ++ = halo de grande espessura (>1mm).

Estudos indicam que o ambiente rizosférico é responsável pelo aumento e pela modulação da diversidade microbiana associada às plantas, o que pode estar relacionado à interação de espécies microbianas com os exsudatos liberados por cada espécie vegetal (HUGONI et al., 2018; OLANREWAJU et al., 2018), atração de determinadas espécies para a rizosfera devido ao padrão de exsudatos liberados (SCHULZ-BOHM et al., 2018) ou ainda à indução da mobilização de plasmídeos por exsudatos radiculares (ZHU et al., 2018). A influência dessa indução sobre a mobilização de plasmídeos simbióticos ainda é desconhecida.

Bactérias não nodulíferas (como *Azospirillum brasilense*) compartilham no genoma pontos homólogos aos genes simbióticos de rizóbios. Além disso, esses genes também estão localizados em plasmídeos no genoma dessa bactéria, assim como em *Rhizobium*, como descrito em trabalho pioneiro por Viellie e Elmerich (1990). Portanto, para bactérias não nodulíferas, a obtenção da característica de fixação biológica de nitrogênio, assim como para nodulíferas, pode ser resultado da transferência horizontal de um plasmídeo simbiótico, o que pode ter influenciado a diversidade de organismos fixadores de nitrogênio associativos assim como influenciou a diversidade de organismos simbióticos.

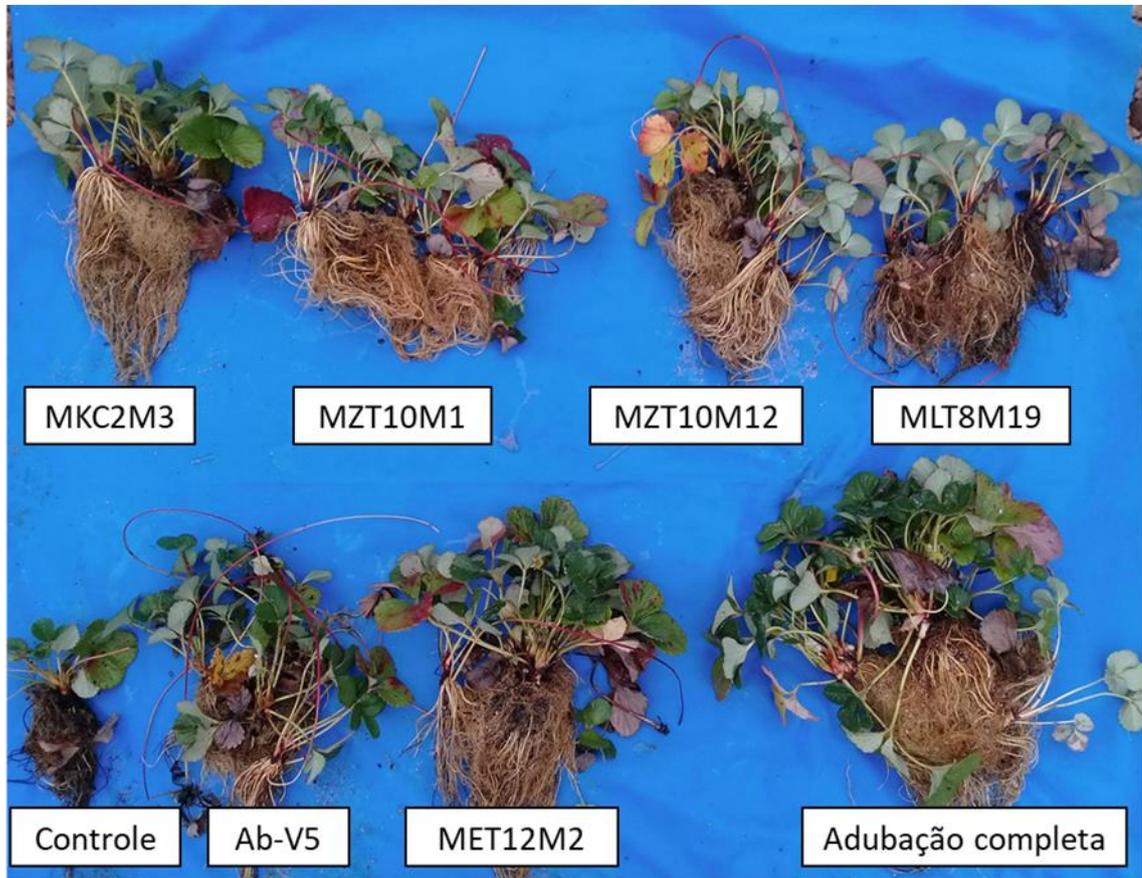
O uso de microrganismos fixadores de nitrogênio na agricultura apresenta-se como uma relevante estratégia à aplicação de fertilizantes nitrogenados aos campos de produção de alimento, pois apesar de o nitrogênio compor cerca de 78% da atmosfera, sua assimilação é limitada, requerendo a transformação para uma forma combinada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; TAIZ e ZEIGER, 2009). Assim, grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados são utilizadas na produção de alimentos, aumentando custos de produção (HUNGRIA et al., 2011) e ambientais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2014).

3.4 Promoção de crescimento de mudas de morango

Dados de produção de auxina e solubilização de fosfato foram avaliados em análise estatística multivariada (dados complementares, tabela 2) e os que apresentaram maiores valores foram selecionados para ensaios posteriores, desde que também apresentassem capacidade de fixação assimbiótica de nitrogênio *in vitro*. Além disso, isolados que pertenciam à gêneros de patógenos humanos ou contaminantes ambientais foram descartados. Finalmente, os isolados MLT8M19, MET12M2, MZT10M1, MZT10M12 e MKC2M3 foram selecionados para ensaios posteriores.

A inoculação de mudas de morango com isolados bacterianos selecionados *in vitro* ocasionou mudanças no crescimento (Figura 3).

Figura 3 – Crescimento de morangueiro inoculado e não-inoculado



Legenda: Nomes abaixo de cada planta são referentes aos tratamentos aos quais foram submetidas. Da esquerda para a direita, a partir de cima: inoculação com o isolado MKC2M3, inoculação com o isolado MZT10M1, inoculação com o isolado MZT10M12, inoculação com o isolado MLT8M19, controle com baixo N e P, inoculação com a estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*), inoculação com o isolado MET12M2 e adubação completa.

A matéria seca de parte aérea (Figura 4A) foi significativamente influenciada pelos tratamentos ($p < 0,05$). A maior produção de matéria seca foi observada no tratamento com adubação completa. Esse tratamento permitiu um aumento de 301,67% na produção de matéria seca de parte aérea. O tratamento com inoculação do isolado MET12M2 permitiu aumento de 279% para a mesma variável. Esse resultado é particularmente interessante quando se leva em conta que, aos tratamentos inoculados, somente foi adicionado 30% da composição total de nitrogênio e fósforo da solução nutritiva. Demais isolados bacterianos testados proporcionaram pouco ou intermediário aumento da matéria seca de parte aérea em

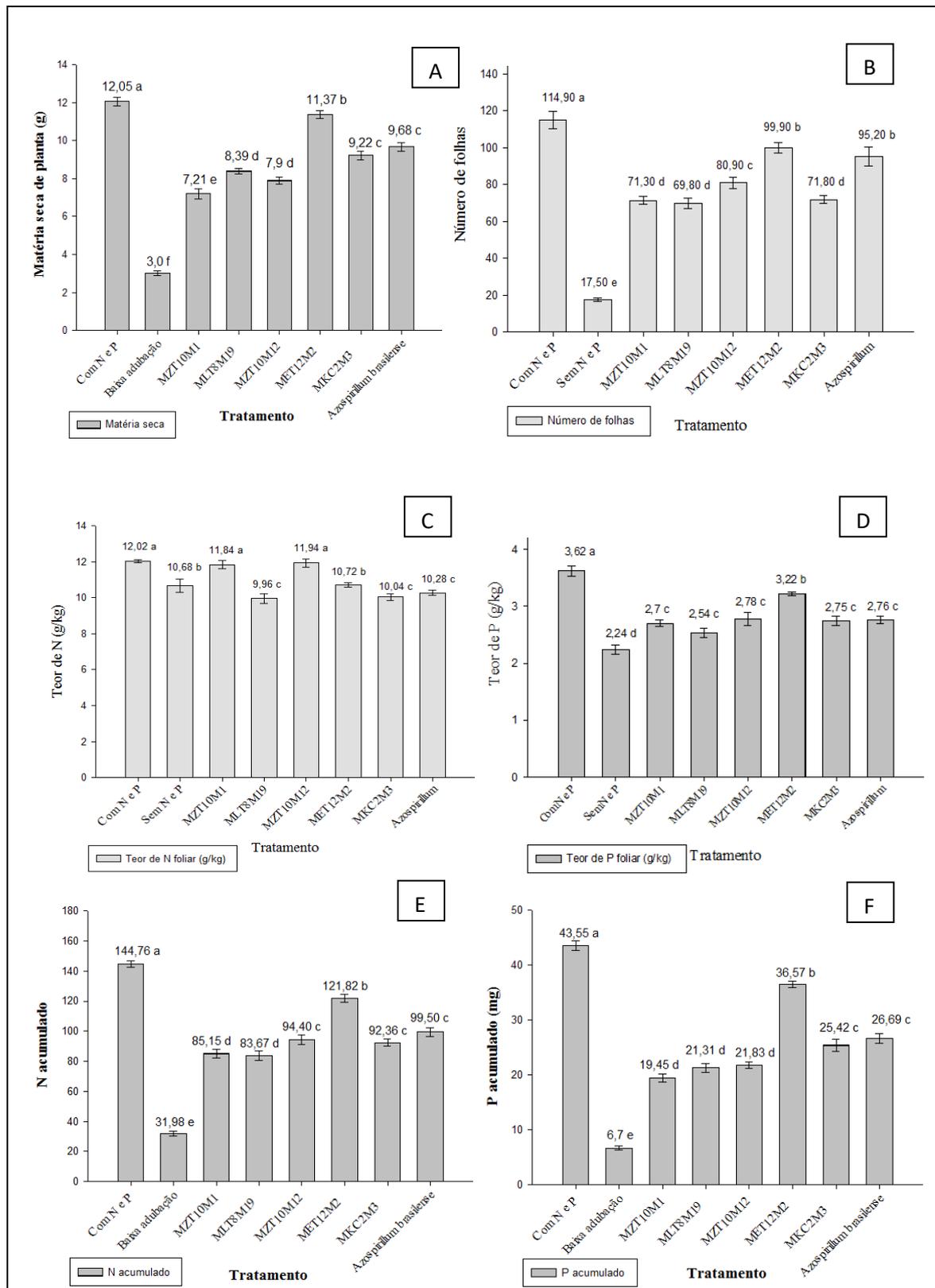
plantas, porém todos os tratamentos diferenciaram-se estatisticamente do tratamento controle com adubação nitrogenada e fosfatada reduzida em 70% e sem inoculação.

Resultado semelhante foi observado para o número de folhas (Figura 4B). Para essa variável, a aplicação de adubação mineral completa promoveu um aumento de 556,57%, significativamente diferenciando-se de todos os outros tratamentos ($p < 0,05$). Ainda assim, a inoculação da estirpe AB-V5 (*Azospirillum brasilense*) e do isolado MET12M2 diferenciaram-se de outros tratamentos, com um aumento de 444% e 470,86% para a mesma variável, respectivamente. Outros isolados apresentaram efeitos intermediários ou baixos na produção de folhas de morangueiro, porém diferenciaram-se significativamente do tratamento com adubação reduzida e sem inoculação.

O conteúdo foliar de nitrogênio (Figura 4C) e fósforo (Figura 4D) de morango foi significativamente influenciado pelos tratamentos ($p < 0,05$). Concernente ao teor de nitrogênio foliar, os maiores valores foram obtidos a partir da aplicação de adubação mineral completa e inoculação dos isolados MZT10M1 e MZT10M12, os quais não foram significativamente diferentes. Plantas do tratamento com adubação mineral completa apresentaram teores de 12,02 g de nitrogênio/kg de planta, ao passo que plantas dos tratamentos com inoculação dos isolados MZT10M1 e MZT10M12 apresentaram teores de 11,84 g N/kg de planta e 11,94 g N/kg de planta, respectivamente. Portanto, a aplicação de adubação mineral completa e a inoculação dos isolados MZT10M1 e MZT10M12 promoveram aumentos de 12,55%, 10,86% e 11,8% em comparação ao tratamento com adubação reduzida e sem inoculação, respectivamente.

A inoculação com o isolado MET12M2 não foi significativamente diferente ao tratamento com adubação reduzida e sem inoculação para o teor de nitrogênio foliar, cada um promovendo teores de 10,72 g de N/kg de planta e 10,68 g de N/kg de planta, respectivamente. Entretanto, plantas dos tratamentos com adubação reduzida e sem inoculação e com inoculação dos isolados MZT10M1 e MZT10M12 apresentaram os menores valores de produção de matéria seca de parte aérea. Pode-se inferir que esse seja um mecanismo de compensação à baixa disponibilidade de nitrogênio pela diminuição da produção de matéria seca e aumento ou manutenção dos teores de nitrogênio em g/kg de planta.

Figura 4 - Matéria seca de plantas (A), número de folhas (B), teor de N foliar (C), teor de P foliar (D), N acumulado (E) e P acumulado (F) de plantas não inoculadas e inoculadas com bactérias endofíticas de morangueiro selecionadas *in vitro*.



Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

A inoculação com os isolados MKC2M3, MLT8M19 e com a estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*) promoveu menores teores de nitrogênio foliar das plantas, sendo esses resultados menores, inclusive, do que o tratamento com adubação reduzida e sem inoculação.

A competição por nutrientes entre microrganismos rizosféricos e plantas já tem sido amplamente relatada. Sobretudo, em situações de baixos níveis de determinados nutrientes, microrganismos podem passar a competir com as plantas pelos mesmos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Resultados de teores de nitrogênio observados neste trabalho para os isolados citados podem potencialmente evidenciar esse fenômeno. Estima-se que a diminuição do teor de nitrogênio nessas plantas também possa estar relacionada à diluição do nutriente no tecido vegetal, devido ao crescimento das plantas.

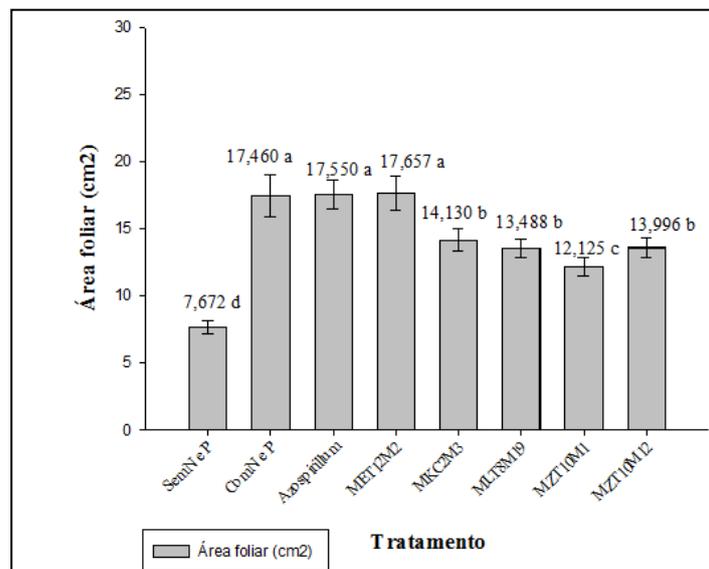
Trabalhos têm demonstrado que a inoculação com algumas bactérias promotoras de crescimento pode controlar a eficiência de uso do nitrato presente no solo por plantas. Trabalhando com inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho, Pii et al (2019) observaram que o microrganismo é capaz de diminuir o uso de nitrogênio na forma de NO_3 por plantas, além de alterar a dinâmica de genes vegetais importantes para o uso do nutriente. É possível que a inoculação de alguns isolados possa ter influenciado negativamente o uso do nitrato da solução, o que auxiliaria a explicar teores de nitrogênio em planta menores do que os observados para o tratamento sem inoculação e com adubação reduzida.

Concernente ao teor de fósforo foliar (Figura 4D), os maiores valores foram obtidos a partir da aplicação de adubação mineral completa com teores de 3,62 g de fósforo/kg de planta. Esse tratamento diferenciou-se estatisticamente dos tratamentos com inoculação e controle, apresentando um aumento de 61,61% em relação ao último citado. A inoculação de mudas com o isolado MET12M2 permitiu um aumento de 43,75% no teor de fósforo foliar em comparação aos valores obtidos para a mesma variável a partir de plantas do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação, sendo que plantas do tratamento inoculado apresentaram teores de 3,22 g de P/kg de planta e plantas do tratamento com adubação reduzida e sem inoculação apresentaram teores de 2,24 g de P/kg de planta. Além disso, o tratamento com inoculação do isolado MET12M2 permitiu maior teor de fósforo, inclusive em comparação à inoculação com outros isolados testados. Entretanto, todos os isolados promoveram maior absorção de fósforo do que o tratamento sem inoculação e com adubação reduzida em plantas, não tendo sido observadas diferenças estatísticas entre dados de teor de fósforo em plantas dos tratamentos com inoculação dos isolados MKC2M3, MLT8M19, MZT10M1, MZT10M12 e a estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*).

Resultados mais expressivos foram obtidos quando observados os dados de nitrogênio (Figura 4E) e fósforo (Figura 4F) acumulados. Para esses dois parâmetros, os maiores valores foram obtidos a partir da aplicação de adubação mineral completa, com um acúmulo de 144,76 mg de N/planta e de 43,55 mg P/planta. Esses valores significam um aumento de 352,66% no acúmulo de nitrogênio e 550% no acúmulo de fósforo em comparação ao tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação. A aplicação de adubação completa foi significativamente diferente de todos os outros tratamentos. Entre os isolados, o maior acúmulo de nitrogênio e fósforo foi observado com a inoculação de MET12M2, com valores de 121,82 mg N/planta e 36,57 mg P/planta, correspondendo à um aumento de 280,93% e 445,82% no acúmulo de nitrogênio e fósforo, respectivamente, em comparação ao tratamento com adubação reduzida e sem inoculação. Outros isolados apresentaram níveis intermediários de acúmulo de nitrogênio e fósforo e todos influenciaram significativamente essa variável, em comparação ao tratamento com adubação reduzida e sem inoculação.

A área foliar (Figura 5) também foi significativamente ($p < 0,05$) influenciada pelos tratamentos. Maiores valores para essa variável foram obtidos nos tratamentos com fornecimento de adubação completa e com a inoculação da estirpe Ab-V5 e do isolado MET12M2. Outros isolados apresentaram valores intermediários para essa variável e todos foram significativamente diferentes do tratamento controle com adubação reduzida/sem inoculação.

Figura 5 - Área foliar de plantas não inoculadas e inoculadas com bactérias endofíticas de morangueiro selecionadas *in vitro*.

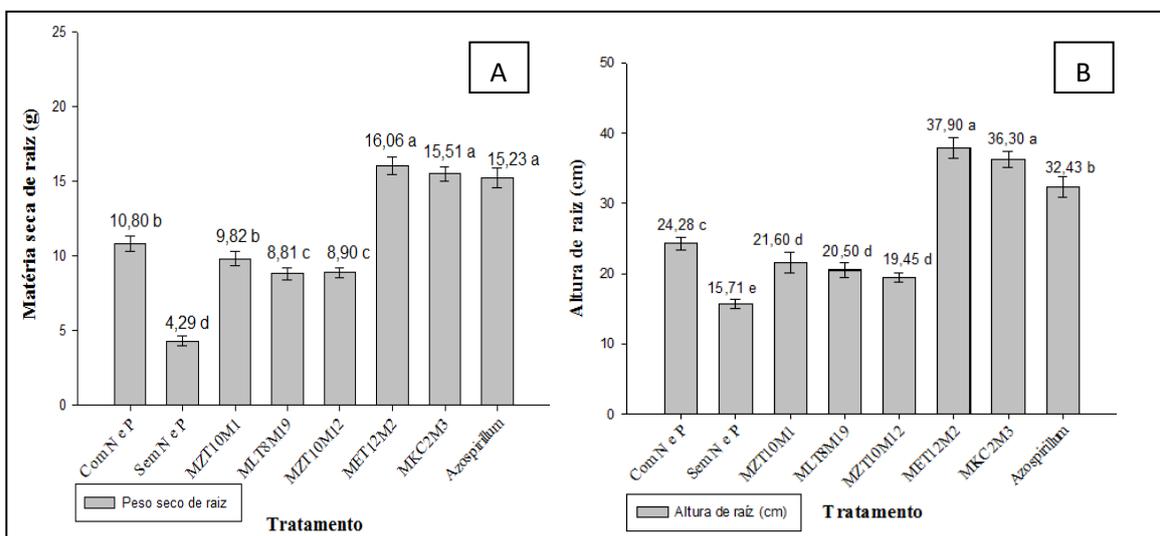


Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram observados por Erdogan et al (2018), quando a inoculação de *Bacillus* e *Pseudomonas* promoveu aumento significativo da área foliar em videiras e por Rodrigues et al (2016) após inoculação de cana-de-açúcar com bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Pantoea* e *Klebsiella*. Especificamente em morango, o aumento de número e área de folíolos e raízes foi observado com a inoculação de *Bacillus* por Vicente-Hernández et al (2018).

A matéria seca (Figura 6A) e altura de raízes (Figura 6B) também foram significativamente influenciadas pelos tratamentos com adubação e com inoculação ($p < 0,05$). A maior produção de raízes (em peso e em altura) foi observada nos tratamentos com inoculação dos isolados MET12M2 e MKC2M3 e da estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*), com valores de 16,06, 15,51 e 15,23 g de raízes e 37,9, 36,3 e 32,43 cm, respectivamente. Esses valores significam um aumento de 274,36%, 261,54% e 255,01% no peso de raízes e de 141,25%, 131,06% e 106,43% no comprimento de raízes com a inoculação dos isolados MET12M2 e MKC2M3 e da estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*), respectivamente.

Figura 6 - Matéria seca de raiz (A) e comprimento de raiz (B) em plantas não inoculadas e inoculadas com bactérias endofíticas de morangueiro selecionadas *in vitro*.



Médias representadas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Dados obtidos neste ensaio evidenciam o efeito da inoculação de microrganismos produtores de auxina no favorecimento da produção de raízes não somente em comprimento, mas também laterais. O tratamento com adubação completa diferenciou-se estatisticamente

desses tratamentos, assim como dos tratamentos com inoculação de outros isolados e do tratamento com adubação reduzida e sem inoculação.

Auxinas são substâncias capazes de promover o crescimento de plantas e estimular a atividade da bomba eletrogênica H^+ - ATPase da membrana plasmática vegetal em concentrações muito baixas. De modo geral, auxinas estão relacionadas ao estímulo do crescimento de raízes (Hager et al., 1991). Neste trabalho, ainda que tenham apresentado produções relativamente intermediárias à baixas de auxinas, os isolados foram capazes de incitar o aumento de raízes nas plantas.

Trabalhando com inoculação de isolados dos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus* capazes de produzir de 1,89 $\mu\text{g/mL}$ a 19,37 $\mu\text{g/mL}$, Pereira et al (2012) observaram aumento de até 184,88% no peso seco de raízes.

Surpreendentemente, os maiores valores de comprimento de raiz e peso seco de raiz obtidos neste trabalho não foram resultantes da inoculação do isolado que apresentou maior potencial de produção de auxina *in vitro*. Esse resultado pode estar relacionado à interação dos isolados com a espécie vegetal, sobretudo a influência dessa interação na sobrevivência e multiplicação dos isolados dentro da planta e no estímulo à respostas de defesa vegetal (MARCHETTI et al., 2014; DU et al., 2017); mas também fato de que auxina em níveis excessivos pode promover o efeito contrário de inibição do crescimento de raízes (SCHLINDWEIN et al., 2008).

Além disso, estudos têm provado que a produção de auxinas não é o único mecanismo pelo qual bactérias promotoras de crescimento podem estimular o crescimento de raízes em plantas. Trabalhando com bactérias do gênero *Bacillus* na planta-modelo *Arabidopsis thaliana*, Hossain et al (2019) observaram que essas bactérias eram capazes de produzir compostos orgânicos voláteis independentemente do sistema de produção de auxina, etileno e jasmonato, os quais foram capazes de induzir desenvolvimento radicular, evidenciando outros tipos de sinalização pelos quais bactérias podem estimular crescimento radicular. Alguns autores também relatam a capacidade de bactérias promotoras de crescimento em produzir compostos capazes de induzir a produção de auxinas pelas plantas (ZHANG et al., 2007).

Ensaio *in vivo* evidenciaram o efeito benéfico da inoculação de mudas de morango com o isolado MET12M2. Curiosamente, o mesmo não apresentou os maiores valores de solubilização de fosfato ou produção de auxina *in vitro*, porém apresentou-se entre os cinco melhores resultados para todos os testes *in vitro*.

O efeito de bactérias promotoras de crescimento vegetal no acúmulo de matéria seca em plantas já tem sido comprovado em gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*,

Burkholderia, *Gluconacetobacter* e *Azospirillum* (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006; ESITKEN et al., 2010; ANDRADE et al., 2019).

Trabalhando com inoculação de *Pseudomonas* e *Bacillus* em morango, Esitken et al (2010) observaram aumento no peso de matéria seca, produtividade e conteúdos de nitrogênio e fósforo foliares. Nesse mesmo trabalho, foi observado aumento de 471,43% dos teores de fósforo foliar.

Na mesma espécie vegetal, trabalhando com a inoculação de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Enterobacter* e *Burkholderia* e adubação mineral contendo 50% da necessidade de nitrogênio, Andrade et al (2019) observaram um aumento de até 96% na matéria seca de plantas quando em comparação aos valores obtidos no tratamento controle contendo 50% da necessidade da espécie vegetal em nitrogênio. Nesse mesmo trabalho, variáveis como comprimento e matéria seca de raízes também foram positivamente influenciadas pela inoculação.

Surpreendentemente, o isolado MKC2M3, identificado previamente como pertencente ao gênero *Rhizobium* (ANDRADE, 2017), foi eficiente em promover crescimento de morango, induzindo diferenças nas variáveis avaliadas, quando em comparação ao tratamento com reduzida adubação e sem inoculação. Bactérias desse gênero são conhecidas por desenvolverem simbioses com leguminosas, formando estruturas conhecidas como nódulos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Ainda que o efeito de rizóbios sobre o crescimento de leguminosas já seja amplamente comprovado, pouco se sabe sobre o efeito desse grupo bacteriano sobre plantas não leguminosas, enquanto bactérias associativas. No presente trabalho, evidencia-se a capacidade de bactérias do gênero *Rhizobium* em induzir crescimento de morango de forma assimbiótica, desenvolvendo uma interação associativa com essa espécie vegetal.

Maiores valores de matéria seca de parte aérea, matéria seca de raiz, comprimento de raiz, número de folhas, teor de nitrogênio e fósforo foliar e nitrogênio e fósforo acumulados encontrados neste trabalho podem ser relacionados à capacidade dos isolados bacterianos em produzir auxina, fixar nitrogênio biologicamente e solubilizar fosfato, sobretudo, levando-se em conta que apenas 30% do nitrogênio e fósforo da solução nutritiva foram fornecidos e que o restante da necessidade de fósforo da cultura foi suprido com o fornecimento de fósforo na forma insolúvel.

4 CONCLUSÃO

Bactérias isoladas de folhas e raízes de morangueiro apresentaram diferentes capacidades de promoção de crescimento vegetal *in vitro*. Isolados selecionados *in vitro* apresentaram diferentes efeitos sobre o crescimento de morangueiro. O isolado MET12M2 foi capaz de promover maiores efeitos sobre o crescimento dessa espécie vegetal, indicando seu potencial enquanto inoculante para a mesma.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.
- ALEXANDRATOS, N; BRUINSMA, J. **World agriculture towards 2030/2050**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012.
- AKINTOKUN,A.K. ; AKANDE,G.A. ; AKINTOKUN,P.O. ; POPOOLA,T.O.S. ; BABALOLA,A.O. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid producing fungi isolated from nigerian soil. **International Journal of Soil Science**, v.2, p.301-307, 2007.
- ANDRADE, F.M.; PEREIRA, T.A.; SOUZA, T.P.; GUIMARÃES, P.H.S.; MARTINS, A.D.; SCHWAN, R.F.; PASQUAL, M.; DÓRIA, J. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223-225, p. 120-128, 2019.
- ANDRADE, F.M. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento e inoculação em morangueiro**. 2017. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Unversidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plant and other organisms. **Annual Review in Plant Biology**. v, 57, p.233-266, 2006.
- BATISTA, B.D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbillis*)**. 2012. 129p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.
- BERRAQUERO,F.R. ; BAYA,A.M. ; CORMENZANA,A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.339-406, 1976.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C. ; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.; SOUZA, E.M. ; LEA, P.J. ; HIREL,B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v.12, n.3. 2017.
- CAPELA, D.; MARCHETTI, M.; CLÉRISSI, C.; PERRIER, A. ; GUETTA, D. ; GRIS, C. ; VALLS, M. ; JAUNEAU, A. ; CRUVEILLER, S. ; ROCHA, E.P.C. ; MASSON-BOIVIN, C. Recruitment of a lineage-specific virulence regulatory pathway promotes intracellular infection by a plant pathogen experimentally evolved into a legume symbiont. **Molecular Biology and Evolution**, v.34, n.10, p.2503-2521, 2017.
- CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L.; FACANHA, A.R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺ - ATPases. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: SBCS, 2006. p.175-200.
- CARDINALE, M.; SUAREZ, C.; STEFFENS, D.; RATERING, S. ; SCHNELL, S. Effect of different soil phosphate sources on the active bacterial microbiota is greater in the rhizosphere than in the endorhiza of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Microbial Ecology**, v.77, n.3, p.689-700, 2019.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, C.J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.33, n.2, p.440-459, 2014.

COELHO JÚNIOR, J. M. Strawberry cultivars: Knowing to expand and reduce the environmental impacts | cultivares de morango: conhecer para expandir e reduzir os impactos ambientais. **Revista Geama**, v. 5, n. 1, p. 138–147, 2016.

COELHO JÚNIOR, J. M. Strawberry farming with lichens: an alternative to the environment cultivo de morangos com líquens: uma alternativa para o ambiente. **Revista Geama**, v. 5, n. 1, p. 123–137, 2016.

DAUBECH, B.; REMIRI, P.; MOURA, G.G.D.; MARCHETTI, M.; POUZET, C.; AURIAC, M.C. ; GOKHALE, C.S. ; MASSON-BOIVIN, C. ; CAPELA, D. Spatio-temporal control of mutualism in legumes helps spread symbiotic nitrogen fixation. **Elife**, 2017.

DIAS, A.C.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D.; LAVACA, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPÇÃO, L.C.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.2, p.189-195, 2009.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews**, v.2, p. 621-631, 2004.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. ; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In : FENDRIK, I. ; GALLO, M. ; VANDERLEYDEN, J. ; ZAMAROCZY, M. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Nato Asi Series, (series G : ecological sciences). Berlin: Ed Springer - Heidelberg, 1995, p.3-14.

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

DOBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In : BALLOWS, A. ; TRUPPER, H.G. ; DWORKIN, M. ; HARDER, W. ; SHLEIFER, K.. **The prokaryotes**. Springer-Verlag, 1991. p.2236-2253.

DU, N. ; SHI, L. ; YUAN, Y. ; LI, B. ; SHU, S. ; SUN, J. ; GUO, S. Proteomic analysis reveals the positive roles of the plant-growth-promoting-rhizobacterium NSY50 in the response of cucumber roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* inoculation. **Frontiers in Plant Science**, v.7, 2016

ERDOGAN, U.; TURAN, M.; ATES, F.; KOTAN, R.; ÇAKMAKÇI, R.; ERDOGAN, Y.; KTIR, N.; TUFENKÇI, S. Effects of root plant growth promoting rhizobacteria inoculations on the growth and nutrient content of grapevine. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.49, n.14, p.1731-1738, 2018.

ESITKEN, A.; YILDIZ, H.E.; ERCISLI, S.; DONMEZ, M.F.; TURAN, M.; GUNES, A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v.124, p.62-66, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. **Production quantities by country**: Average 2016 – 2017. 2019. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em 21 jan. 2019

FELESTRINO, E.B. ; SANTIAGO,I.F ; FREITAS,L.S. ; ROSA,L.H. ; RIBEIRO, S.P. ; MOREIRA, L.M. Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaeae* rhizosphere host biological interface: a neglected model of bacterial prospectation. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 2017.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura** : agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2013, 421p.

FLORES-FÉLIX, J.D.; VELÁZQUEZ, E.; GARCÍA-FRAILE, P.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; SILVA, L.R.; RIVAS, R. *Rhizobium* and *Plylobacterium* bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. **Food Research International**, v. 111, p.416-422, 2018.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia** : processo ecológico em agricultura sustentável. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, 2000. 653p.

GUERRERO-MOLINA, M.F. ; WINIK, B.C. ; PEDRAZA,R..O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v.61, p.205-212, 2012.

GORDON,S.A. ; WEBER,R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, n.1, p.192-195, 1951.

HAGER, A.; DEBUS, G.; EDEL, H.G.. STRANSKY, H.; SERRANO, R. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺ - ATPase. **Planta**, v.185, p.527-537, 1991.

HERNÁNDEZ,A.G. **Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão**. 2015. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

HOAGLAND, D.; ARNON,D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 1950. 347p (Documentos).

HOSSAIN, M.T.; KHAN, A.; HARUN-ON-RASHID, M.; CHUNG, Y.R. A volatile producing endophytic *Bacillus siamensis* YC7012 promotes root development independent on auxin or ethylene/jasmonic acid pathway. **Plant Soil**, p.-1-16, 2019.

HUGONI, M.; LUIS, P.; GUYONNET, J.; HAICHAR, F.Z. Plant host habitat and root exudates shape fungal diversity. **Mycorrhiza**, v.28, p.451-463, 2018.

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

HUNTER, M.C.; SMITH, R.G.; SCHIPANSKI, M.E.; ATWOOD, L.W.; MORTENSEN, D.A. Agriculture in 2015: recalibrating targets for sustainable intensification. **BioScience**, v.67, n.4, 2017.

ILMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from Forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n.4, p.389-395, 1992.

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.V.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; AZAROVA, T.; AKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Organic acids, sugars and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.19, n.2, p.250-256, 2006.

KLOEPPER, J.W. ; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In : **Internacional conference on plant pathogenic bacteria**, 4, 1978. Angers : Institute National de la Recherche Agronomique, 1978, v.2, p.879-882.

KOO,S.Y. ; CHO, K.S. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.11, p.1431-1438, 2009.

KRAVCHENKO, L.; AZAROVA, T.; MAKAROVA, N.; TIKHONOVICH, I. The effect of tryptophan of plant root metabolites on the phytostimulating activity of rhizobacteria. **Microbiology**, v.73, n.1, p.195-198, 2004.

LOACES,I. ; FERRANDO,L. ; SCAVINO,A.F. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. **Microbial Ecology**, v.61,n.3, p.606-618, 2011.

LINU, M.S.; AJU, K.; ASOK, J.; SREEKUMAR, J.; JISHA, M.S. Mineral phosphate solubilization by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chilli (*Capsicum annum* L.) fields. **Journal of Tropical Agriculture**, v.55, n.2, p.134-144, 2017.

LIU, Y.; CHEN, L.; ZHANG, N.; ZUNFENG, L. ; ZHANG, G. ; XU, Y. ; SHEN, Q. ; ZHANG, R. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SWR9. **MPMI**, v.29, n.4, p.324-330, 2016.

MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Ceres, 1980. 251p.

MARCHETTI, M. ; CAPELA, D. ; GLEW, M. ; CRUVEILLER, S. ; CHANE-WOON-MING, B. ; GRIS, C.; TIMMERS, T.; POINSOT, V.; GILBERT, L.B.; HEEB, P.; MÉDIGUE, C.; BATUT, J.; MASSON-BOIVIN, C. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. **Plos One**, v.8, n.1, 2010.

MARCHETTI, M.; JAUNEAU, A.; CAPELA, D.; REMIGI, P. ; GRIS, C. ; BATUT, J. ; MASSON-BOIVIN, C. Shaping bacterial symbiosis with legumes by experimental evolution. **MPMI**, v.27, n.9, p.956-964, 2014.

MARRA, L.M.; OLIVEIRA-LONGATTI, S.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVARES, F.L.; MOREIRA, F.M.S. The amount of phosphate solubilization depends on the strain, C-source, organic acids and type of phosphate. **Geomicrobiology Journal**, 2019.

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R.F.; LIMA, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v.357, p.289-307, 2012.

MARRA, L.M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas**. 2012. 141p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

- MARTÍNEZ-VIVEROS, M.A.; JORQUERA, D.E.; CROWLEY, G.M.L.M.; MORA, M.L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of the Science of Plant Nutrition**, v.10, n.3, p.293-319, 2010.
- MASSON-BOIVIN, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. **Trends in Microbiology**, v.17, n.10, p.458-466, 2009.
- MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v.51, p.326-335, 2006.
- MISHRA, G. ; SAPRE, S. ; SHARMA, A. ; TWARI, S. Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Biology**, v.18, n.6, p.992-1000, 2016.
- MORAIS, M.C.; MUCHA, A.; FERREIRA, H.; GONÇALVES, B.; BACELAR, E.; MARQUES, G. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.
- MOREIRA, F.M.S. ; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, 2ed. Lavras: Editora UFLA, 2006, 729p.
- NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011.
- OLEANREWAJU, O.S.; AYANGBENRO, A.S.; GLICK, B.; BABALOLA, O.O. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.3, p.1155-1166, 2018.
- OLIVEIRA, A.L.M.; COSTAS, K.R.; FERREIRA, C.; MILLANI, M.L.; SANTOS, O.J.A.P.; SILVA, M.B.; ZULUAGA, M.Y.A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, n.1, p.56-77, 2014.
- PEDRAZA, R.O.; MOTOK, J.; TORTORA, M.L.; SALAZAR, S.M.; DÍAZ-RICCI, J.C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant and Soil**, v.29, p.169-178, 2007.
- PEREIRA, G.V.M.; MAGALHÃES, K.T.; LORENZENTII, E.R.; SOUZA, T.P.; SCHWAN, R.F. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v.63, p.405-417, 2012.
- PUENTE, M.E.; LI, C.Y.; BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p.389-401, 2009.
- PII, Y.; ALDRIGHETTI, A.; VALENTINUZZI, F.; MIMMO, T.; CESCO, S. *Azospirillum brasilense* inoculation counteracts the induction of nitrate uptake in maize plants. **Journal of Experimental Botany**, v.70, n.4, p.1313-1324, 2019.

- QUECINE, M.C.; ARAUJO, W.L.; ROSSETTO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI,S.; LACAVAL, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.21, p. 7511-7518, 2012.
- RAIJ, B.V. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ADBALLA, S.R.S. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 107-115.
- RAMSAY, J.P.; SULLIVAN, J.T.; STUART, G.S.; LAMONT, I.L.; RONSON, C.W. Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. **Molecular Microbiology**, v.62, p. 723-734, 2006.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- RODRIGUES, A.A.; FORZANI, M.V.; SOARES, R.S.; SIBOV, S.T.; VIEIRA, J.D.G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.2, p.149-158, 2016.
- SCHULZ-BOHM, K.; GERARDS, S.; HUNDSCHIED, M.; MELENHORST, J.; BOER, W.; GARBEVA, P. Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles. **The ISME Journal**, v.12, p.1252-1262, 2018.
- SHAH, D.A.; SEN, S.;SHALINI, A.; GHOSH, D.; GROVER, M.; MOHAPATRA, S. An auxin secreting *Pseudomonas putida* rhizobacterial strain that negatively impacts water-stress tolerance in Arabidopsis thaliana. **Rhizosphere**, v.3, p.16-19, 2017.
- SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C. Influence of rhizobial inoculation on seedling vigor and germination of lettuce. **Ciência Rural**, v.38, p.658-664, 2008.
- SILVA, F.C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa, 2009, 627p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Porto Alegre: SBCS, 2004, 400p.
- SPAEPEN, S. Plant hormones produced by microbes. In: LUGTENBERG, B. **Principles of plant microbe interactions: microbes for Sustainable Agriculture**. Cham:Springer International Publishing, 2015, p.247-256.
- SHRIVASTAVA, M.; SHRIVASTAVA, P.C.; D'SOUZA, S.F. Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. In: MEENA, V.S. **Role of rhizospheric microbes in soil**. Singapura: Springer. 2018, p.137-165.
- SULEMAN, M.; YASMIN, S.; RASUL, M.; YAHYA, M.; ATTA, B.M.; MIRZA, M.S. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. **Plos One**, v.13, n.9, 2018.

SYSTAT SOFTWARE Inc. **Sigmaplot for Windows, version 13**. 2006. Disponível em: <http://www.systat.com/products/sigmaplot/>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p

TODESCHINI, V.; AITLAHMIDI, N.; MAZZUCCO, E.; MARSANO, F.; GOSETTI, F.; ROBOTTI, E.; BONA, E.; MASSA, N.; BONNEAU, L.; MARENGO, E.; WIPF, D.; BERTA, G.; LINGUA, G. Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality and volatilome. **Frontiers in Plant Science**, v.9, n.1611, 2018.

TORRES, D.; BENAVIDEZ, I.; DONADIO, F.; MONGIARDINI, S.; ROSAS, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; PENCIK, A.; NOVAK, O.; STMAD, M.; FREBORTOVA, J.; CASSÁN, F. New insights into auxin metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. **Research in Microbiology**, v.169, n.6, p. 313-323, 2018.

VALÉ, M.; NGUYEN, C.; DAMBRINE, E.; DUPOUEY, J.L. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.2329-2333, 2005.

VERMA, S.K.; KINGSLEY, K.; BERGEN, M.; ENGLISH, C.; ELMORE, M.; KHARWAR, R.N.; WHITE, J.F. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. **Plant Soil**, v.422, n.1-2, p.223-238, 2018.

VICENTE-HERNÁNDEZ, A.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; VALENCIA-CANTERO, E.; RAMÍREZ-ORDORICA, A.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GARCÍA-JUÁREZ, P.; MARCÍAS-RODRIGUEZ, L. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Aromas') plants in vitro and slows *Botrytis cinerea* infection by two different methods of interaction. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-13, 2018.

VIEILLE, C.; ELMERICH, C. Characterization of two *Azospirillum brasilense* Sp7 plasmid genes homologous to *Rhizobium meliloti* nodPQ. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.3, n.6, p.389-400, 1990.

YANG, Y.; TILMAN, D.; LEHMAN, C.; TROST, J.J. Sustainable intensification of high-diversity biomass production for optimal biofuel benefits. **Nature Sustainability**, v.1, p.686-692, 2018.

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1059-1065, 2008.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v.47, p.138-145, 2011.

ZAHEER, A.; MIRZA, B.S.; McLEAN, J.E.; YASMIN, S.; SHAH, T.M.; MALIK, K.A.; MIRZA, M.S. Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. **Research in Microbiology**, v.167, n.6, p.510-520, 2016.

ZHANG, H.; KIM, M.S.; KRISHNAMACHARI, V.; PAYTON, P.; SUN, Y.; GRIMSON, M.; FARAG, M.A.; RYU, C.M.; ALLEN, R.; MELO, I.S.; PARÉ, P.W. Rhizobacterial

volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta**, v.226, p.839-851, 2007.

ZHAO, C.Z.; HUANG, J.; GYANESHWAR, P.; ZHAO, D. Rhizobium sp. IRBG74 alters *Arabidopsis* root development by affecting auxin signaling. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.2556, 2018.

ZHU, H.; ZHANG, L.; SHANSHAN, L.; YUJING, W.; SHURONG, S.; CHEN, J.; KOU, S. The rhizosphere and root exudates of maize seedlings drive plasmid mobilization in soil. **Applied Soil Ecology**, v.124, p.194-202, 2018.

DADOS COMPLEMENTARES

Tabela 2 – Seleção de isolados obtidos a partir de raízes e folhas a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio assimbioticamente. Análise de componentes principais (continua).

| Isolado | Score | FBN* | Grupo |
|----------------|--------------|-------------|--------------|
| MLT8M19 | 3,74 | ++ | 16 |
| MET12M2 | 3,00 | ++ | 11 |
| MZT10M1 | 2,78 | + | 18 |
| 127 | 2,57 | + | 3 |
| MZT10M12 | 2,31 | + | 19 |
| 30 | 2,26 | - | 7 |
| MKC2M3 | 2,08 | ++ | 15 |
| MIT13M12 | 2,03 | - | 15 |
| 23 | 1,77 | - | 6 |
| 133 | 1,56 | - | 4 |
| 123 | 1,55 | - | 1 |
| MGT3M15 | 1,55 | + | 10 |
| MQT4M1 | 1,53 | - | 6 |
| 93 | 1,48 | + | 1 |
| 121 | 1,42 | ++ | 1 |
| MSC2M5 | 1,32 | + | 1 |
| MHT8M6 | 1,32 | + | 4 |
| MQT16M1 | 1,26 | - | 17 |
| MIT11M11 | 1,23 | + | 14 |
| 128 | 1,22 | - | 1 |
| MFT4M8 | 1,20 | - | 1 |
| 56 | 1,08 | + | 10 |
| MIT15M14 | 1,07 | ++ | 1 |
| MQT10M16 | 0,94 | + | 1 |
| MGT5M13 | 0,94 | ++ | 1 |
| 75 | 0,93 | - | 1 |
| 34 | 0,82 | ++ | 1 |
| 51 | 0,81 | - | 10 |
| 9 | 0,80 | + | 1 |
| 79 | 0,79 | - | 1 |
| MNT10M4 | 0,78 | - | 1 |
| MST15M4 | 0,77 | + | 1 |
| MFT5M11 | 0,77 | + | 1 |
| 44 | 0,72 | - | 9 |
| 43 | 0,71 | - | 1 |
| 13 | 0,69 | + | 1 |
| MGT3M6 | 0,67 | - | 13 |

Legenda: scores e agrupamento calculados a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato. *FBN: Fixação biológica de nitrogênio. - : incapaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; + : capaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; ++ : formação de halo aerotático maior do que 1mm.

Tabela 2 – Seleção de isolados obtidos a partir de raízes e folhas a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio assimbioticamente. Análise de componentes principais (continua).

| Isolado | Score | FBN* | Grupo |
|----------------|--------------|-------------|--------------|
| 50 | 0,66 | - | 1 |
| 139 | 0,64 | - | 1 |
| MET16M10 | 0,58 | ++ | 12 |
| 69 | 0,56 | - | 1 |
| 136 | 0,49 | - | 1 |
| 17 | 0,48 | + | 1 |
| 80 | 0,46 | - | 1 |
| 153 | 0,44 | - | 1 |
| MTT9M2 | 0,43 | - | 1 |
| 122 | 0,43 | ++ | 1 |
| MDT10M17 | 0,42 | + | 1 |
| 12 | 0,42 | - | 1 |
| 28 | 0,39 | - | 1 |
| 84 | 0,36 | ++ | 1 |
| 29 | 0,32 | - | 1 |
| 137 | 0,32 | - | 1 |
| 113 | 0,26 | - | 1 |
| 73 | 0,25 | ++ | 1 |
| 119 | 0,23 | + | 1 |
| 1 | 0,17 | - | 1 |
| 117 | 0,16 | ++ | 1 |
| MST13M1 | 0,14 | - | 1 |
| 22 | 0,13 | - | 1 |
| 63 | 0,11 | - | 1 |
| 92 | 0,05 | ++ | 1 |
| MPT6M12 | 0,04 | - | 1 |
| 108 | 0,01 | - | 1 |
| 101 | -0,01 | - | 1 |
| 94 | -0,01 | ++ | 1 |
| 8 | -0,02 | + | 1 |
| 184 | -0,02 | - | 1 |
| 2 | -0,04 | + | 1 |
| MIT3M11 | -0,04 | ++ | 1 |
| 14 | -0,05 | - | 1 |
| 47 | -0,07 | - | 1 |
| MDT7M5 | -0,07 | + | 1 |
| MST12M1 | -0,09 | + | 1 |
| 16 | -0,10 | - | 1 |
| 6 | -0,10 | - | 1 |
| 107 | -0,15 | - | 1 |
| 104 | -0,15 | - | 1 |
| | | | 1 |
| 87 | -0,16 | - | 1 |

Legenda: scores e agrupamento calculados a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato. *FBN: Fixação biológica de nitrogênio. - : incapaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; + : capaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; ++ : formação de halo aerotáxico maior do que 1 mm.

Tabela 2 – Seleção de isolados obtidos a partir de raízes e folhas a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio assimbioticamente. Análise de componentes principais (continua).

| Isolado | Score | FBN* | Grupo |
|----------------|--------------|-------------|--------------|
| 21 | -0,21 | - | 1 |
| 77 | -0,23 | ++ | 1 |
| 100 | -0,25 | - | 1 |
| 15 | -0,27 | - | 1 |
| 88 | -0,28 | - | 1 |
| 70 | -0,30 | ++ | 1 |
| 115 | -0,32 | + | 1 |
| MST6M3 | -0,34 | + | 1 |
| 65 | -0,40 | - | 1 |
| MDT12M6 | -0,42 | - | 1 |
| 24 | -0,43 | + | 1 |
| 116 | -0,45 | + | 1 |
| MXT16M12 | -0,46 | - | 1 |
| 135 | -0,54 | - | 1 |
| 86 | -0,57 | + | 1 |
| 138 | -0,60 | - | 1 |
| MVT12M8 | -0,62 | - | 1 |
| MRT15M8 | -0,72 | - | 1 |
| 154 | -0,78 | - | 1 |
| 132 | -0,79 | - | 1 |
| MHT7M | -0,81 | - | 1 |
| 57 | -0,84 | + | 1 |
| MXT7M12 | -0,85 | ++ | 1 |
| 27 | -0,90 | ++ | 1 |
| MTT5M10 | -0,94 | ++ | 1 |
| 39 | -1,01 | ++ | 1 |
| MZT3M14 | -1,02 | - | 1 |
| 179 | -1,04 | - | 1 |
| MXT12M2 | -1,07 | ++ | 1 |
| MTT12M4 | -1,08 | - | 1 |
| MAT16M4 | -1,08 | - | 1 |
| 131 | -1,10 | - | 1 |
| 68 | -1,16 | - | 2 |
| 40 | -1,19 | - | 8 |
| 125 | -1,19 | + | 1 |
| 151 | -1,21 | ++ | 1 |
| 54 | -1,23 | - | 1 |
| 182 | -1,33 | - | 2 |
| 124 | -1,35 | - | 2 |
| MZT3M5 | -1,36 | - | 20 |
| 58 | -1,56 | + | 1 |
| 112 | -1,57 | + | 1 |

Legenda: scores e agrupamento calculados a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato. *FBN: Fixação biológica de nitrogênio. - : incapaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; + : capaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; ++ : formação de halo aerotático maior do que 1mm.

Tabela 2 – Seleção de isolados obtidos a partir de raízes e folhas a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio assimbioticamente. Análise de componentes principais.

| Isolado | Score | FBN* | Grupo |
|----------------|--------------|-------------|--------------|
| 33 | -1,67 | + | 1 |
| 152 | -1,67 | - | 1 |
| 111 | -1,67 | - | 1 |
| MTT16M8 | -1,71 | ++ | 1 |
| 53 | -1,78 | + | 1 |
| 143 | -1,82 | - | 1 |
| 60 | -1,85 | - | 1 |
| 26 | -1,86 | ++ | 1 |
| 129 | -1,87 | - | 1 |
| 109 | -1,88 | ++ | 1 |
| MLT14M7 | -1,90 | - | 1 |
| 31 | -1,99 | + | 1 |
| 181 | -2,38 | - | 5 |
| MQT6M1 | -2,38 | - | 5 |

Legenda: scores e agrupamento calculados a partir da capacidade de produzir auxina, solubilizar fosfato. *FBN: Fixação biológica de nitrogênio. - : incapaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; + : capaz de fixar nitrogênio assimbioticamente; ++ : formação de halo aerotáxico maior do que 1mm

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA ANATOMIA FOLIAR E FISIOLOGIA DE MORANGUEIRO

RESUMO

Bactérias promotoras de crescimento são microrganismos capazes de desenvolver interações harmônicas com plantas, induzindo crescimento via diferentes mecanismos. O uso dessas bactérias em campos de produção pode ser uma importante estratégia. Porém detalhes da interação entre plantas e microrganismos ainda são pouco ou não são elucidados. Efeitos desses organismos sobre a anatomia e fisiologia vegetal têm sido relatados. Portanto, objetivou-se com esse estudo testar *in vivo* efeitos da inoculação de cinco bactérias selecionadas *in vitro* para a promoção de crescimento vegetal sobre a anatomia foliar e parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese em morangueiro. Isolados previamente selecionados *in vitro* quanto à capacidade de produzir auxinas, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio biologicamente foram inoculados em morangueiro e seus efeitos sobre anatomia foliar (espessura do mesofilo, da epiderme adaxial, da epiderme abaxial, do parênquima esponjoso e do parênquima paliçádico) e parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese (taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática, concentração interna de CO₂, eficiência no uso da água e eficiência instantânea de carboxilação) foram avaliados. A inoculação de bactérias promoveu mudanças anatômicas e fisiológicas significantes em morangueiro. Entre os isolados testados, resultados mais expressivos para as variáveis estudadas foram observados com a inoculação do isolado MET12M2. De modo geral, efeitos observados neste trabalho foram estirpe-dependentes. Ensaios *in vivo* evidenciam interação dos isolados testados com morangueiro e o potencial de uso do isolado MET12M2 como promotor de crescimento para morango.

PALAVRAS-CHAVE: Interação planta-bactéria; rizobactérias; bactéria endofítica; fotossíntese.

ABSTRACT

Growth promoting bacteria are a group of microorganisms capable of developing harmonic interactions with plants, inducing growth through different mechanisms. The use of these bacteria in production fields can be an important strategy. However details of the interaction between plants and these microorganisms are still not very clear and are not elucidated. Recently, the effects of these organisms on plant anatomy and physiology have been reported. Therefore, the aim of this study was to evaluate in vivo effects of inoculating five bacteria isolated from strawberry leaves and roots (and selected in vitro for their plant-growth promotion ability) on strawberry leaf anatomy and strawberry physiological parameters related to photosynthesis. Isolates previously selected in vitro for their ability to produce auxins, solubilize phosphate and nitrogen fixation were inoculated in strawberry and their effects on leaf anatomy (thickness of mesophyll, adaxial epidermis, abaxial epidermis, spongy parenchyma and palisade parenchyma) and physiological parameters related to photosynthesis (CO_2 assimilation rate, stomatal conductance, CO_2 internal concentration, water use efficiency and instantaneous carboxylation efficiency) were evaluated. Bacteria inoculation promoted significant anatomical and physiological changes in strawberry. Among the isolates, more significant results were observed under inoculation of the MET12M2 isolate. The effects observed in this work were strain-dependent. In vivo assays show interaction of the tested isolates with strawberry and the potential use of the MET12M2 isolate as a strawberry growth-promoter.

KEYWORDS: Plant-bacteria interaction; rhizobacteria; endophytic bacteria; photosynthesis.

1 INTRODUÇÃO

Bactérias promotoras de crescimento vegetal são microrganismos capazes de desenvolver interações harmônicas com plantas, exercendo funções relativamente comuns entre organismos e relacionadas ao fornecimento de nutrientes, produção de fitorreguladores, aumento da tolerância à estresse ambiental e controle biológico de fitopatógenos (GLICK, 2012), além da modulação do metabolismo vegetal (DU et al., 2016; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017).

Diferentes efeitos desses microrganismos em plantas já são relatados, como aumento da matéria seca de parte aérea e de raízes de plantas (ANDRADE et al., 2019), aumento da produtividade (ESITKEN et al., 2010), aumento do peso de pseudofrutos (TODESCHINI et al., 2018; MORAIS et al., 2019), indução de tolerância à estresse (MISHRA et al., 2016), aumento do conteúdo de auxina de plantas (AHMED; HASNAIN, 2010), aumento do número de flores e qualidade de pseudofrutos (TODESCHINI et al., 2018) e aumento de área foliar de plantas. Com base nos efeitos apresentados, uma grande diversidade de bactérias tem sido descrita como potencial promotora de crescimento (VEJAN et al., 2016).

Devido aos efeitos sobre o crescimento e a produtividade de plantas, bactérias promotoras de crescimento representam uma alternativa à sistemas produtivos intensivos, permitindo a diminuição do uso de produtos químicos, como os fertilizantes (ANDRADE et al., 2019).

Entretanto, ainda que o crescimento de plantas resultante do uso de bactérias promotoras seja descrito, não são completamente ou são pouco elucidados detalhes dessa interação, como mudanças anatômicas e fisiológicas resultantes da inoculação desses microrganismos em plantas (CALZAVARA et al., 2018).

Mudanças na anatomia foliar (LARRABURU; LLORENTE, 2015) e radicular (CALZAVARA et al., 2018) têm sido relatadas após inoculação de plantas com bactérias promotoras de crescimento. Além disso, modificações em parâmetros relacionados à fotossíntese, como taxa de assimilação de CO₂, condutividade estomática, taxa de transpiração e eficiência de uso da água, têm sido descritas em plantas inoculadas com esses microrganismos (LI; XU; GAO, 2016; CALZAVARA et al., 2018; MORAIS et al., 2019).

Ainda assim, são raros ou inexistentes e recentes os trabalhos que relacionem a inoculação de bactérias promotoras de crescimento com mudanças anatômicas e fisiológicas em morangueiro. Portanto, objetiva-se com esse trabalho avaliar efeitos da inoculação de

cinco bactérias selecionadas *in vitro* para a promoção de crescimento vegetal sobre a anatomia foliar e parâmetros fisiológicos relacionados à fotossíntese em morangueiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e cultivo dos isolados

Os isolados utilizados neste trabalho foram previamente obtidos em isolamento a partir de folhas e raízes de morangueiro da cultivar Aromas, como descrito por Andrade (2017) e posterior seleção *in vitro* para a produção de auxina, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato e *in vivo* para promoção direta de crescimento de mudas de morango (artigo/capítulo 1).

Os isolados bacterianos foram reativados em meio ágar-nutriente (3g L^{-1} de extrato de carne, 5g L^{-1} de peptona, 15g L^{-1} de ágar). Para a produção de inoculantes, os isolados foram cultivados em meio caldo nutriente (3g L^{-1} de extrato de carne, 5g L^{-1} de peptona).

Em todos os testes, os isolados foram mantidos a 30°C para o crescimento, sendo que, quando cultivados em meio líquido, foram mantidos sob agitação constante de 120rpm em shaker sob as mesmas condições citadas acima.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6,8 a 7,0, quando necessário, com solução 1 mol L^{-1} de HCl ou NaOH e, em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2 Experimento em casa de vegetação

Cinco isolados selecionados em testes de promoção direta de crescimento *in vitro* foram avaliados quanto a sua capacidade de promoção de crescimento vegetal em morangueiro a partir de um ensaio conduzido em casa de vegetação sob delineamento inteiramente casualizado (com 10 repetições para análises fisiológicas e 3 repetições para análises anatômicas). Para esses ensaios, cada isolado foi considerado um tratamento, além dos tratamentos controle com adubação nitrogenada e fosfatada reduzida em 70% e sem inoculação de bactéria, com adubação completa e controle com a inoculação de *Azospirillum brasilense*. Em ambos os ensaios, mudas de morango da cultivar Aromas obtidas por cultura de tecidos foram cultivadas em substrato inerte composto de areia e vermiculita na proporção 1:1 (v:v). Além disso, foi adicionado fosfato natural de Argélia com 29% de P_2O_5 e

solubilidade igual a 2% em ácido cítrico ao substrato em todos os tratamentos. Para tanto, o fosfato foi calculado para o fornecimento de 260kg/ha de P_2O_5 (SBCS, 2004). O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 1 hora por três vezes, com 24 horas de diferença entre cada esterilização.

As mudas foram mantidas em vasos de volume igual a 5L de substrato. Todas as plantas foram irrigadas a cada 2 dias com água destilada autoclavada. Além disso, a cada 5 dias foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (completa para o controle positivo e com 30% de nitrogênio e fósforo para os tratamentos com inoculação dos isolados bacterianos e controle negativo). A solução completa de Hoagland e Arnon (1950) utilizada para o tratamento sem inoculação + adubação completa foi composta de 1mLL⁻¹ de KH_2PO_4 (1mol/L), 5mLL⁻¹ KNO_3 (1mol/L), 5mLL⁻¹ de $Ca(NO_3)_2$ (1mol/L), 2mLL⁻¹ de $MgSO_4$ (1mol/L), 1mL de solução de micronutrientes (2,86gL⁻¹ de H_3BO_3 , 1,81gL⁻¹ $MnCl_2$, 0,22gL⁻¹ de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,08 gL⁻¹ de $NaMoO_4 \cdot 4H_2O$) e 1mL de Fe-EDTA (24, 1gL⁻¹ de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 25,1gL⁻¹ de EDTA). A composição da solução com reduzida adição de nitrogênio e fósforo (30% da necessidade total) consistiu na substituição de KH_2PO_4 , KNO_3 e $Ca(NO_3)_2$ por 5,7 mLL⁻¹ de KCl (1mol/L), 5mLL⁻¹ de $CaCl_2$ (1mol/L), 0,3 mLL⁻¹ de KH_2PO_4 (1mol/L) e 3mLL⁻¹ de NH_4NO_3 (1,5mol/L) (HERNÁNDEZ, 2015).

O inóculo bacteriano foi previamente preparado pelo cultivo dos isolados selecionados nos testes *in vitro* de promoção de crescimento em meio caldo nutriente a 30°C sob agitação constante de 120 rpm durante 48 horas e posterior ajuste da concentração celular para 1×10^8 células/mL (densidade óptica de 0,5 a um comprimento de onda de 600nm mensurada em espectrofotômetro, de acordo com a escala de Mc Farland).

Ao final, foram avaliadas variáveis relacionadas à mudanças fisiológicas e anatômicas em plantas.

2.2.1 Avaliação fisiológica de plantas

A avaliação da condição fisiológica de plantas inoculadas e não inoculadas foi realizada pela quantificação de trocas gasosas utilizando-se o sistema portátil de medidas de fotossíntese (IRGA, Infrared Gas Analyzer – Li-6400 XT, Licor). Com essa finalidade, foi realizada uma leitura por planta em cada tratamento de forma casualizada, em dia ensolarado sem nebulosidade das 9h as 12h. Cada tratamento foi composto por 10 repetições. O fluxo da câmara foi fixo em 500 $\mu\text{mol s}^{-1}$, e a PAR (radiação fotossinteticamente ativa) interna em 1000 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ (HENSCHERL, 2016).

Foram aferidos dados de assimilação líquida de CO₂ ou rendimento fotossintético (A, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), concentração intercelular de CO₂ (C_i, $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{ ar}$), condutância estomática (G_s, $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e taxa de transpiração (E, $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A eficiência do uso da água foi determinada pela relação entre assimilação de CO₂ e taxa de transpiração (A/E). A eficiência de carboxilação (A/C_i) foi determinada pela relação entre assimilação de CO₂ e concentração intercelular de CO₂ na folha.

2.2.2 Avaliação anatômica de plantas

Características anatômicas de plantas inoculadas e não inoculadas foram avaliadas. Com essa finalidade, foram selecionadas folhas expandidas, livres de patógenos e herbivoria de 3 indivíduos de *Fragaria x ananassa* dos tratamentos com e sem inoculação. O material coletado foi conservadas/fixado em recipientes contendo etanol 70%. Em seguida, foram realizadas secções transversais em 3 folhas de cada indivíduo e foram analisados 3 campos/folha. As secções transversais foram obtidas de fragmentos de 2cm² retirados das regiões medianas das folhas, contendo a nervura central. Os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%) e infiltrados em resina líquida 1:1 (v:v) por 24 horas e em resina ativada por 5 dias.

Finalizado o processo de infiltração, o material foi adicionado à histomoldes contendo uma solução de inclusão, conforme instruções do fabricante (kit Historesina Leica Microsystems Wetzlar Germany). Os fragmentos foram polimerizados em estufa a 37°C. Posteriormente, o material foi fixado em blocos de madeira para microtomia. As amostras foram seccionadas em micrótomos semiautomático e os cortes submetidos à coloração com azul de toluidina (FEDER; O'BRIEN, 1968). Fotografias das secções foram capturadas em microscópio óptico Zeiss com câmera digital acoplada (AzioCam ERc5s) e as análises foram feitas por meio do software ImageJ, visando a medição dos tecidos foliares. As variáveis analisadas na lâmina foliar foram espessura da epiderme nas superfícies adaxial e abaxial da folha (μm), espessura total do limbo (μm) e espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso (μm).

2.3 Análise estatística

Resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas no software R (R Core Team, 2019) pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Mudanças fisiológicas em plantas inoculadas

A inoculação de mudas de morango com isolados bacterianos selecionados *in vitro* ocasionou mudanças fisiológicas nas plantas (Tabela 1). A taxa de assimilação de CO₂ foi significativamente influenciada pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados em tratamentos com inoculação do isolado MET12M2 e da estirpe Ab-V5. O uso dessas bactérias induziu um aumento de 146,58% e 147,32% na taxa de assimilação de CO₂, respectivamente. Plantas sob o tratamento com adubação completa diferenciaram-se dos tratamentos inoculados e do controle sem inoculação e com adubação reduzida. Tratamentos com outros isolados apresentaram valores intermediários para esse parâmetro e todos, com exceção do isolado MZT10M12, foram estatisticamente diferentes do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação.

Li, Xu e Gao (2016) relatam que a inoculação de *Bacillus subtilis* em *Arabidopsis thaliana* foi capaz de aumentar a capacidade fotossintética de plantas, sendo a mesma relacionada no trabalho ao aumento dos teores de nitrogênio e fósforo foliares. Ainda, o aporte de nitrogênio às plantas foi também relacionado à mudanças no aparato fotossintético importantes para o aumento da capacidade fotossintética. No presente trabalho, tratamentos que permitiram maior acúmulo de nitrogênio pelas plantas também induziram maior capacidade fotossintética (artigo/capítulo 1).

Além disso, estudos apontam aumento no conteúdo de clorofila a, clorofila b e carotenóides em plantas inoculadas, o que também induz aumento da capacidade fotossintética de plantas (VAFADAR; AMOOAGHAIE; OTROSHY, 2014; JANG et al., 2018; TODESCHINI et al., 2018).

Tabela 1- Parâmetros fisiológicos em mudas de morango não inoculadas e inoculadas com bactérias endofíticas selecionadas *in vitro* quanto à capacidade de promoção direta de crescimento vegetal.

| Tratamento | Taxa de assimilação de CO₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)* | Condutividade estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)* | Concentração interna de CO₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)* | Taxa de transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)* | Eficiência de uso de água ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ⁻¹ * | Eficiência instantânea de carboxilação ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)($\mu\text{mol mol}^{-1}$) ⁻¹ * |
|---------------------|---|---|--|--|---|--|
| <i>Azospirillum</i> | 16.62 a | 0.299 a | 262.29 b | 11.52 a | 1.44 a | 0.064 a |
| Com N e P | 14.84 b | 0.252 b | 257.06 b | 100.32 a | 1.45 a | 0.058 a |
| MET12M2 | 16.57 a | 0.316 a | 269.29 b | 11.05 a | 1.51 a | 0.062 a |
| MKC2M3 | 11.47 c | 0.244 b | 275.75 b | 11.53 a | 1.00 b | 0.042 b |
| MLT8M19 | 9.39 d | 0.216 c | 293.44 a | 10.38 a | 0.92 c | 0.032 c |
| MZT10M1 | 8.94 d | 0.189 c | 292.21 a | 9.16 b | 0.99 b | 0.031 c |
| MZT10M12 | 6.90 e | 0.130 d | 277.83 b | 6.61 c | 1.05 b | 0.025 d |
| 30% N e P | 6.72 e | 0.145 d | 271.87 b | 7.95 b | 0.84 c | 0.025 d |

Legenda:* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott a 5%.

Entretanto, em alguns casos, estima-se que o aumento da taxa fotossintética em plantas inoculadas esteja relacionado ao fornecimento de compostos carbonados às bactérias, o que aumenta a demanda por esse tipo de moléculas e diminui sua disponibilidade para a construção da biomassa vegetal. Nesses casos, o aumento da taxa fotossintética não se reflete em maior produção de matéria seca pelas plantas (CALZAVARA et al., 2018).

O efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento e da aplicação de adubação completa sobre a condutividade estomática das plantas também foi observado. Os maiores valores para essa variável foram observados em tratamentos com inoculação do isolado MET12M2 e da estirpe Ab-V5. O uso dessas bactérias induziu um aumento de 117,93% e 106,21% na condutividade estomática, respectivamente. A aplicação de adubação completa e de inoculação do isolado MKC2M3 não foram significativamente diferentes, porém diferenciaram-se dos tratamentos inoculados e do controle sem inoculação e com adubação reduzida. Tratamentos com outros isolados apresentaram valores intermediários para esse parâmetro e todos, com exceção do tratamento com o isolado MZT10M12, foram estatisticamente diferentes do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação.

Barbosa (2016) também observou que a diminuição da assimilação de CO₂ também foi influenciada pela diminuição da condutância estomática em plantas submetidas à estresse. Nesse mesmo trabalho, a inoculação de bactérias promotoras de crescimento eficientes promoveu aumento da condutância estomática, mesmo em situações de estresse para as plantas, chegando ao mesmo nível da condutância estomática observada para plantas não submetidas à estresse ambiental, o que também foi observado neste trabalho com relação ao estresse nutricional ao qual as plantas foram submetidas.

Valores de concentração interna de CO₂ apresentaram um padrão diferente de resposta aos tratamentos, em comparação com os parâmetros fisiológicos acima citados. Valores mais altos para essa variável foram observados nos tratamentos com inoculação dos isolados MZT10M1 e MLT8M19, com 292,21 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 293,44 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de concentração interna de CO₂, respectivamente. Todos os outros tratamentos não foram significativamente diferentes entre si.

A condutância estomática é um parâmetro fisiológico muito importante, sendo responsável por indicar o fechamento de estômatos, o que influencia diretamente na saída de água e na entrada de CO₂ (FERRAZ et al., 2014). Neste trabalho, tratamentos que induziram o crescimento de plantas também permitiram maiores valores de condutância estomática. Surpreendentemente, não foi observada diferença entre tratamentos eficientes para o crescimento de plantas e o tratamento com adubação reduzida + sem inoculação para a

concentração interna de CO₂. De modo geral, a redução da condutância estomática deveria limitar a absorção de carbono pelas plantas devido à redução da abertura estomática. Resultados muito semelhantes foram observados por Barbosa (2016), trabalho no qual plantas submetidas à estresse apresentaram menor condutância estomática, porém não apresentaram menor concentração interna de CO₂.

De acordo com Bertolli, Souza e Souza (2015), esse fenômeno pode ser explicado devido ao fato de que, em situações de estresse (como, por exemplo, menor nutrição) ocorrem falhas no fotossistema e o carbono presente em câmaras subestomáticas não é facilmente acessado, ainda que presente em altas quantidades no estômato.

A taxa de transpiração foi significativamente influenciada pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados em tratamentos com inoculação dos isolados MET12M2, MKC2M3, MLT8M19, da estirpe Ab-V5 e com aplicação de adubação mineral completa. Esses tratamentos induziram um aumento de 38,99%, 45,03%, 30,57%, 44,31% e 29,81% na taxa de transpiração, respectivamente. Plantas sob o tratamento com adubação completa diferenciaram-se dos tratamentos inoculados e do controle sem inoculação e com adubação reduzida. Tratamentos com outros isolados apresentaram valores intermediários para esse parâmetro. A inoculação do isolado MZT10M12 não induziu taxa de transpiração estatisticamente diferente à do tratamento com adubação reduzida e sem inoculação. O menor valor para esse parâmetro foi observado a partir da inoculação do isolado MZT10M1.

O aumento da taxa de transpiração também foi induzido pela inoculação de bactérias promotoras de crescimento em trabalho de Barbosa (2016), mesmo em plantas sob estresse hídrico. No entanto, a influência da inoculação sobre a taxa de transpiração de plantas submetidas a estresse nutricional ainda resta pouco discutida na literatura.

A diminuição da taxa de transpiração em plantas não inoculadas ou inoculadas com bactérias menos eficientes para a promoção de crescimento está diretamente relacionada à diminuição da condutância estomática, pois o fechamento dos estômatos diminui a transpiração (ALBUQUERQUE et al., 2013).

No que tange a eficiência no uso da água, os maiores valores foram encontrados para os tratamentos com adubação mineral e com inoculação do isolado MET12M2 e da estirpe Ab-V5, sendo estes valores 1,45, 1,51 e 1,44 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)⁻¹, respectivamente. A inoculação com os isolados MKC2M3, MZT10M1 e MZT10M12 induziu valores intermediários para essa variável. Menores valores de eficiência do uso da água foram

observados para os tratamentos com inoculação do isolado MLT8M19 e controle com adubação reduzida e sem inoculação.

A influência da inoculação de bactérias promotoras de crescimento sobre a eficiência do uso da água já tem sido descrita na literatura. Trabalhando com inoculação de *Bacillus subtilis* em *Vicia faba* L., Li, Xu e Gao (2016) observaram aumento dessa variável, ocasionado pela regulação da abertura estomática em folhas e da taxa de assimilação de CO₂. No presente trabalho, assim como no trabalho de Li, Xu e Gao (2016), a inoculação de bactérias eficientes para a promoção de crescimento de morango também induziu a maior eficiência do uso da água e o aumento da taxa de assimilação de CO₂.

A eficiência no uso da água expressa a quantidade de carbono fixado na fotossíntese para cada molécula de água perdida (JAIMEZ et al., 2005). O aumento da eficiência do uso de água em tratamentos com inoculação de bactérias promotoras de crescimento eficientes ou com adubação justifica-se, pois, devido às altas taxas de assimilação de CO₂, maior quantidade de dióxido de carbono foi utilizada por molécula de água perdida, ao passo que, em tratamentos com adubação reduzida ou com inoculação de isolados menos eficientes, devido à diminuição da condutância estomática, menos CO₂ foi assimilado. O CO₂ acumulado estava potencialmente inacessível ao aparato fotossintético e menos CO₂ foi utilizado na fotossíntese por molécula de água perdida. Portanto, em tratamentos menos eficientes para a promoção de crescimento, apesar de as plantas perderem menos água por transpiração, menos CO₂ é assimilado para a fotossíntese.

Concernente a eficiência instantânea de carboxilação, os maiores valores foram encontrados para os tratamentos com adubação mineral e com inoculação do isolado MET12M2 e da estirpe Ab-V5, sendo estes valores 0,058, 0,062 e 0,064 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)⁻¹, correspondendo a 132%, 148% e 156% de aumento desse parâmetro, respectivamente. A inoculação de outros isolados induziu valores intermediários de eficiência instantânea de carboxilação. Os menores valores para essa variável foram observados com a inoculação do isolado MZT10M12 e no tratamento sem inoculação e com adubação reduzida.

A eficiência de carboxilação expressa o quanto do CO₂ foi utilizado para a realização de fotossíntese. Em condições de estresse, ocorre a diminuição da eficiência de uso da água devido à menor absorção de CO₂ devido ao fechamento estomático, o que leva à diminuição da taxa fotossintética (DUTRA et al., 2015, BARBOSA, 2016). Em estudos de Barbosa (2016), a inoculação com bactérias promotoras de crescimento induziu maior eficiência instantânea de carboxilação, o que está de acordo com o observado neste trabalho.

Resultado muito similar foi encontrado por Tiepo (2017) quando, trabalhando com inoculação da estirpe Ab-V5 também observou aumento da eficiência instantânea de carboxilação em plantas.

Especificamente em morango, a inoculação de *Bacillus* e *Pedobacter* incitou a mudança de muitos parâmetros fisiológicos, sendo eles aumento de taxa de assimilação de CO₂, condutividade estomática, taxa de transpiração e eficiência de uso da água (MORAIS et al., 2019).

O mesmo foi observado por Jang et al (2018), com inoculação de *Bacillus*. Esses autores observaram que indução do aumento da taxa de assimilação de CO₂ está diretamente relacionada ao aumento nos teores de clorofila das plantas ocasionado pelas bactérias e ao aumento do conteúdo de nitrogênio das plantas. No presente trabalho, bactérias que induziram aumento na taxa de assimilação de CO₂ também foram capazes de induzir aumento de nitrogênio foliar acumulado (artigo/capítulo 1).

A indução da taxa de assimilação de CO₂ após inoculação de bactérias promotoras de crescimento também pode ser explicada a nível molecular. Trabalhos têm demonstrado a influência de compostos voláteis dessas bactérias sobre a expressão de genes das plantas relacionados à fotossíntese. Kim et al (2015), trabalhando com tabaco, observaram que a inoculação com bactérias do gênero *Bacillus* levou à uma grande alteração na expressão dos genes que codificam para proteína ligante de clorofila, 1,7-sedoheptulose bifosfatase e proteína P, todas envolvidas no processo de fotossíntese. Especificamente, o aumento da expressão da 1,7-sedoheptulose bifosfatase no cloroplasto já tem sido relacionado ao aumento da eficiência fotossintética de plantas (LEFEBVRE et al., 2005). Em ensaios *in vitro* com *Arabidopsis thaliana*, Zhang et al (2007) também observaram que mais de 10 genes associados à cloroplastos apresentaram diferença de expressão quando as plantas foram expostas à compostos voláteis de *Bacillus subtilis*.

3.2 Modificações anatômicas em plantas

Observações óticas de seções transversais de folhas (Figura 1) de morangueiro evidenciaram a presença de epidermes adaxial e abaxial monoestratificadas e duas ou três camadas de parênquima paliçádico. Células do parênquima paliçádico apresentam aspecto retangular, ao passo que células do parênquima esponjoso apresentam aspecto circular e diferentes tamanhos.

Tabela 2 - Modificações anatômicas em folhas de morangueiro inoculado e não inoculado com bactérias promotoras de crescimento selecionadas *in vitro*.

| Tratamento | Espessura do limbo foliar | Epiderme adaxial | Epiderme abaxial | Parênquima paliçádico | Parênquima lacunoso |
|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Adubação completa | 223,546 b | 37,874 b | 26,408 b | 75,437 b | 80,908 a |
| 30% da composição de N e P da solução | 178,873 e | 32,684 c | 23,584 c | 64,846 c | 56,679 c |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | 203,284 c | 32,781 c | 21,760 c | 77,066 b | 62,141 c |
| MET12M2 | 249,994 a | 45,639 a | 31,381 a | 98,001 a | 84,450 a |
| MKC2M3 | 202,733 c | 35,371 b | 23,048 c | 69,746 c | 73,783 b |
| MLT8M19 | 195,891 d | 31,783 c | 22,842 c | 74,827 b | 65,060 c |
| MZT10M1 | 194,184 d | 33,128 c | 23,993 c | 76,971 b | 65,979 c |
| MZT10M12 | 196,304 d | 28,701 d | 22,972 c | 75,539 b | 64,542 c |

Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5%

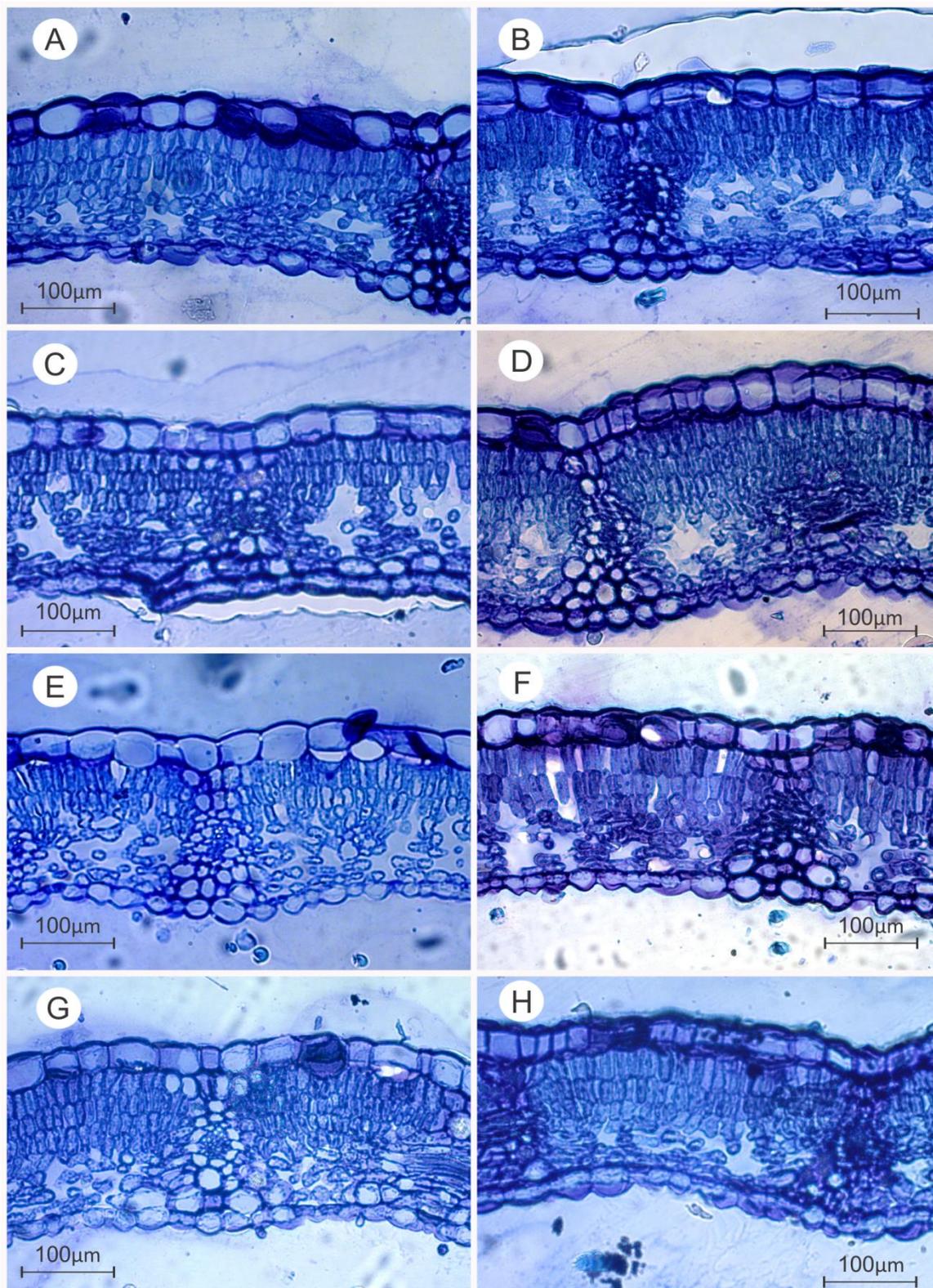
A inoculação de bactérias promotoras de crescimento, assim como a aplicação da solução nutritiva completa, aumentou significativamente ($p < 0,05$) a espessura do mesófilo de morangueiro (Tabela 2). O maior valor para essa variável foi observado com a inoculação do isolado MET12M2 (249,994 μm), o qual induziu um aumento de 39,76% em comparação ao tratamento com adubação reduzida e sem inoculação (178,873 μm).

A espessura das epidermes adaxial e abaxial também foi significativamente ($p < 0,05$) influenciada pelos tratamentos. O isolado MET12M2 induziu aumento mais expressivo para ambas as variáveis, seguido pelo isolado MKC2M3 e adubação completa (para epiderme adaxial) e adubação completa (para epiderme abaxial). Outros isolados induziram valores intermediários para essas variáveis, não sendo significativamente diferentes aos valores observados no tratamento com adubação reduzida e sem inoculação. A inoculação do isolado MZT10M12 levou à diminuição da espessura da epiderme adaxial à valores menores do que os observados no tratamento com adubação reduzida e sem inoculação.

Os tratamentos apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso. Maiores valores para a primeira variável foram observados com a inoculação do isolado MET12M2 (98,001 μm) e, para a segunda variável, com a inoculação do isolado MET12M2 e com aplicação de solução nutritiva completa (84,450 μm e 80,908 μm , respectivamente). No que tange a variável espessura do parênquima paliçádico, adubação completa e outros isolados que não MET12M2 apresentaram efeito intermediário e diferente do observado para o tratamento com adubação reduzida e sem inoculação, à exceção do isolado MKC2M3. Para a variável espessura do parênquima esponjoso, além da adubação completa e da inoculação de MET12M2, a inoculação do isolado MKC2M3 promoveu crescimento intermediário, ao passo que outros isolados não induziram efeito diferente ao observado com o tratamento com adubação reduzida e sem inoculação.

Sabe-se que condições de estresse nutricional ou de qualquer outra origem ambiental podem induzir alterações anatômicas em plantas (LARRABURU; LLORENTE, 2015). Nesse cenário, plantas submetidas a estresse podem apresentar folhas de menor espessura de mesófilo e de parênquima paliçádico e com maior espessura de parênquima esponjoso, sobretudo devido ao aumento do número de espaços intracelulares nesse tecido (HAZARIKA, 2006; ZIV; CHEN, 2008; LARRABURU; LLORENTE, 2015).

Figura 1 – Cortes anômicos de folhas de morangueiro



Legenda: Corte transversal. A: controle sem inoculação e reduzida adubação; B: controle com adubação completa; C: inoculação da estirpe Ab-V5; D: inoculação do isolado MET12M2; E: inoculação do isolado MKC2M3; F: inoculação do isolado MLT8M19; G: inoculação do isolado MZT10M1; H: inoculação do isolado MZT10M12.

Esse efeito também foi observado no presente trabalho, em que o tratamento com 30% da composição em N e P da solução e sem inoculação induziu aumento da espessura do parênquima esponjoso em plantas igual ao aumento em tratamentos com inoculação de isolados. Entretanto, esses tratamentos induziram aumento da espessura do parênquima paliçádico, o que não foi observado no tratamento controle. O inverso aconteceu para o isolado MKC2M3, que induziu diminuição do parênquima paliçádico e aumento do parênquima esponjoso. A inoculação do isolado MET12M2 induziu o aumento de ambos os parâmetros, o que levou ao aumento considerável da espessura do mesófilo.

O efeito da inoculação de bactérias sobre a anatomia de folhas é, provavelmente, dependente da exsudação de auxina. Trabalhos relatam que modificações na espessura do mesófilo e da epiderme em plantas inoculadas estão relacionados à presença de auxina em níveis baixos à intermediários, ao passo que, altos níveis de auxina podem diminuir diferenças anatômicas entre plantas inoculadas e não inoculadas (LARRABURU; LLORENTE, 2015). Isolados testados no presente trabalho foram selecionados *in vitro* para a produção de auxina e essa característica pode ter influência sobre as mudanças anatômicas em plantas induzidas por esses organismos.

O aumento da espessura do parênquima tem sido relacionado à capacidade de multiplicação celular das bactérias dentro das plantas, que varia entre isolados (LARRABURU; APÓSTOLO; LLORENTE, 2010), mas também ao maior acúmulo de nutrientes, haja vista que o parênquima é um tecido de reserva (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Parênquimas de órgãos fotossintetizantes são clorofilados, contendo cloroplastos responsáveis pela fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2009). O aumento da espessura do parênquima após inoculação de bactérias promotoras de crescimento pode, portanto, estar relacionado à indução da fotossíntese nessas plantas.

Entretanto, o efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento sobre a anatomia de plantas pode estar relacionado, além da fitoestimulação, à outros mecanismos ocorrendo durante a interação com as plantas e que ainda não são completamente elucidados (BASHAN; DE BASHAN, 2010).

À conhecimento, esse é o primeiro relato de mudanças anatômicas em morangueiro e um dos poucos relatos de mudanças fisiológicas na mesma espécie vegetal após a inoculação de bactérias promotoras de crescimento. Portanto, resultados obtidos no presente trabalho representam um avanço na compreensão da interação entre essa espécie com bactérias desse grupo.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a inoculação de morangueiro com cinco isolados selecionados *in vitro* para promoção de crescimento vegetal tem efeitos significativos sobre a anatomia foliar e a fisiologia vegetal. O isolado MET12M2 induziu resultados promissores para todas as variáveis avaliadas neste trabalho, evidenciando sua interação com o morangueiro.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; HASNAIN, S. Auxin-producing *Bacillus* sp.: auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. **Pure Applied Chemistry**, v.82, n.1, p.313-319, 2010.
- ALBUQUERQUE, M.P.F.; MORAES, F.K.C.; SANTOS, R.I.N.; CASTRO, G.L.S.; RAMOS, E.M.L.S.; PINHEIRO, H.A. Ecofisiologia de plantas jovens de mogno-africano submetidas à déficit hídrico e reidratação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.1, p.9-16, 2013.
- ANDRADE, F.M.; PEREIRA, T.A.; SOUZA, T.P.; GUIMARÃES, P.H.S.; MARTINS, A.D.; SCHWAN, R.F.; PASQUAL, M.; DÓRIA, J. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v.223-225, p.120-128, 2019.
- ANDRADE, F.M. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento e inoculação em morangueiro**. 2017. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- BARBOSA, D.D. **Desenvolvimento vegetativo e parâmetros fisiológicos em genótipos de amendoim sob déficit hídrico e inoculados com rizóbios**. 2016. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth- a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v.108, p.77-136, 2010.
- BERTOLLI, S.C.; SOUZA, J.; SOUZA, G.M. Caracterização fotossintética da espécie isohídrica pata-de-elefante em condições de deficiência hídrica. **Revista Caatinga**, v.28, n.3, p.196-205, 2015.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.; SOUZA, E.M.; LEA, P.J.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v.12, n.3, 2017.
- CALZAVARA, A.K.; PAIVA, P.H.G.; GABRIEL, L.C.; OLIVEIRA, A.L.M.; MILANI, K.; OLIVEIRA, H.C.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, A.; OLIVEIRA, M.C.N.; DIAS-PEREIRA, J.; STOLF-MOREIRA, R. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v.20, p.870-878, 2018.
- DU, N. ; SHI,L. ; YUAN,Y. ; LI,B. ; SHU,S. ; SUN,J. ; GUO,S. Proteomic analysis reveals the positive roles of the plant-growth-promoting-rhizobacterium NSY50 in the response of cucumber roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* inoculation. **Frontiers in Plant Science**, v.7, 2016.
- DUTRA, A.F.; MELO, A.S.; FILGUEIRA, L.M.B.; SILVA, A.R.F.; OLIVEIRA, I.M.; BRITO, M.E.B. Parâmetros fisiológicos e componentes de produção de feijão-caupi cultivado sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.10, n.2, p.189-197, 2015.
- ESITKEN, A.; YILDIZ, H.E.; ERCISLI, S.; FIGEN-DONMEZ, M.; TURAN, M.; GUNES, A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v.124, p.62-66, 2010.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v.55, n.1, p.123-142, 1968.

FERRAZ, R.L.S.; BELTRÃO, N.E.M.; MELO, A.S.; MAGALHÃES, I.D.; FERNANDES, P.D.; ROCHA, M.S. Trocas gasosas e eficiência fotoquímica de cultivares de algodoeiro herbáceo sob aplicação de silício foliar. *Semina: Ciências Agrárias*, v.35, n.2, p.735-748, 2014.

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

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.105-120, 2006.

HENSCHER, J.M. **Morangueiro cultivado sob diferentes cores de coberturas em túnel baixo**. 2016. 104p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Centro – Oeste, Guarapuava, 2016.

HERNÁNDEZ, A.G. **Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão**. 2015. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 1950. 347p (Documentos).

JAIMEZ, R.E.; RADA, F.; GARCIA-NUNEZ, C.; AZOCAR, A. Seasonal variations in leaf gas Exchange of plantain cv. Harton (Musa AAB) under different soil water conditions in a humid tropical region. **Scientia Horticulturae**, v.104, p.79-89, 2005.

JANG, J.H.; KIM, S.H.; KHAINI, I.; KWAK, M.J.; LEE, H.K.; LEE, T.Y.; LEE, W.Y.; WOO, S.Y. Physiological changes and growth promotion induced in poplar seedlings by the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus subtilis* JS. **Photosynthetica**, v.56, n.4, p.1188-1203, 2018.

KIM, J.S.; LEE, J.; SEO, S.G.; LEE, C.; WOO, S.Y.; KIM, S.H. Gene expression profile affected by volatiles of new plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* strain JS, in tobacco. **Genes and Genomics**, v.37, n.4, p.387-397, 2015.

LEFEBVRE, S.; LAWSON, T.; ZAKHLENIUK, O.V.; LLOYD, J.C.; RAINES, C.A. Increased sedoheptulose-1,7-biphosphatase activity in transgenic tobacco plants stimulates photosynthesis and growth from an early stage in development. **Plant Physiology**, v.138, p.451-460, 2005.

MISHRA, I.G.; SAPRE, S.; SHARMA, A.; TIWARI, S. Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Biology**, v.18, n.6, p.992-1000, 2016.

LARRABURU, E.E.; LLORENTE, B.E. Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in in vitro rooting of pink lapacho. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.122, p.175-184, 2015.

LARRABURU, E.E.; APÓSTOLO, N.M.; LLORENTE, B.E. Anatomy and morphology of photinia (*Photinia x fraseri* Dress) in vitro plants inoculated with rhizobacteria. **Trees**, v.24, p. 635-642, 2010.

LI, Y.; XU, S.; GAO, J. *Bacillus subtilis* – regulation of stomatal movement and instantaneous water use efficiency in *Vicia faba*. **Plant Growth Regulation**, v.78, p.43-55, 2016.

MORAIS, M.C.; MUCHA, A.; FERREIRA, H.; GONÇALVES, B.; BACELAR, E.; MARQUES, G. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. Porto Alegre, 2004. 400p.

SYSTAT SOFTWARE Inc. **Sigmaplot for Windows, version 13**. 2006. Disponível em: <http://www.systat.com/products/sigmaplot/>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p

TIEPO, A.N. **Efeitos da associação de bactérias promotoras do crescimento em mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume (Cannabaceae) e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae), sob condições de déficit hídrico no solo**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

TODESCHINI, V.; AITLAHMIDI, F.; ROBOTTI, E.; BONA, E.; MASSA, N.; BONNEAU, L.; MARENGO, E.; WIPF, D.; BERTA, G.; LINGUA, G. Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatilome. **Frontiers in Plant Science**, v.9, 2018.

VAFADAR, F.; AMOOAGHAIE, R.; OTROSHY, M. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Plant Interactions**, v.9, p.128-136, 2014.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; BOYCE, A.N. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. **Molecules**, v.21, 2016.

ZHANG, H.; KIM, M.S.; KRISHNAMACHARI, V.; PAYTON, P.; SUN, Y.; GRIMSON, M.; FARAQ, M.A.; RYU, C.M.; ALLEN, R.; MELO, I.S.; PARÉ, P.W. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta**, v.226, p.839-851, 2007.

ZIV, M.; CHEN, J. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. In: GEORGE, E.; HALL, M.; DE-KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer. 2008, p.465-479.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO SOBRE PRODUTIVIDADE E QUALIDADE DE PSEUDOFRUTOS DE MORANGO

RESUMO

O morango é um pseudofruto de grande importância e apreciação no mundo, principalmente devido à suas características sensoriais e nutracêuticas. Entretanto, a cultura é extremamente demandante em termos de fertilidade química do solo, o que gera a necessidade de aplicação de fertilizantes químicos em campos produtivos, ocasionando efeitos ambientais e aumento dos custos de produção. Nesse contexto, bactérias promotoras de crescimento vegetal podem ser aplicadas como uma alternativa ao modo de produção atual, pois são capazes de estimular o crescimento de plantas por diferentes mecanismos. Ainda que o efeito desses organismos sobre o crescimento de plantas seja descrito, consequências de sua inoculação sobre a produtividade e qualidade de pseudofrutos de morango ainda não são elucidadas. Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito de cinco isolados bacterianos oriundos de folhas e raízes de morangueiro e selecionados *in vitro* e *in vivo* para a promoção direta de crescimento sobre produtividade e qualidade de pseudofrutos de morango. Cinco isolados bacterianos selecionados previamente para a promoção de crescimento de morango foram inoculados em mudas da mesma espécie vegetal e avaliados quanto à sua capacidade de influenciar a produtividade e a qualidade de pseudofrutos (teores de sólidos solúveis, fenólicos totais, pH, acidez titulável, teores de vitamina C, atividade antioxidante, perfil de fenólicos e volatiloma). Os isolados avaliados apresentaram diferentes efeitos sobre a produtividade de morango, sendo que o isolado MET12M2 induziu resultados de aumento de produtividade, de número de pseudofrutos por planta e peso de pseudofruto mais promissores. A inoculação dos isolados bacterianos afetou de diferentes formas a qualidade de pseudofrutos, com alguns isolados permitindo aumento de sólidos solúveis, ácido cítrico e atividade antioxidante em pseudofrutos. A inoculação com os isolados bacterianos induziu à modulação do perfil de fenólicos e, sobretudo, do volatiloma, com observação de ésteres, alcoóis e terpenos relacionados ao sabor doce, fresco e frutado de morangos. Conclui-se que a inoculação de morangueiro com os cinco isolados testados e, sobretudo, com o isolado MET12M2 induz ao aumento da produtividade de morango e modificações importantes na qualidade dos frutos.

PALAVRAS-CHAVE: Interação planta-bactéria; rizobactérias; bactéria endofítica; volatiloma; compostos fenólicos.

ABSTRACT

Strawberry is a fruit of great importance and appreciation in the world, mainly due to its sensorial and nutraceutical characteristics. However, this crop is extremely demanding in terms of chemical soil fertility, which generates the need for the application of chemical fertilizers in productive fields, causing environmental effects and increasing production costs. In this context, plant growth-promoting bacteria can be applied as an alternative to strawberry production, since they are able to stimulate plant growth by several mechanisms. Although the effect of these organisms on the growth of plants is described, the consequences of their inoculation on the productivity and quality of strawberry pseudofruits are not yet elucidated. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of five bacteria isolated from strawberry leaves and roots on strawberry fruits production and quality. Five bacterial isolates previously selected for plant growth-promotion ability were inoculated on strawberry plants and evaluated based on their ability to influence fruit production and quality (soluble solids, total phenolics, pH, titratable acidity, vitamin C, antioxidant activity, phenolic profile and volatilome). All isolates presented different effects on strawberry production, and among them, the MET12M2 isolate induced more promising results for fruit production, number of fruits per plant and fruit weight. Bacterial inoculation affected fruit quality in different ways. Some of them, allowed increases in fruit soluble solids, citric acid and antioxidant activity. Bacterial isolates induced the modulation of phenolic and, above all, fruit volatile profile (esters, alcohols and terpenes related to the fresh and the fruity flavor of strawberries). We conclude that strawberry inoculation with the five tested isolates, and especially with the MET12M2 isolate, induces an increase in strawberry production and important changes in fruit quality.

KEY WORDS: Plant-bacteria interaction; rhizobacteria; endophytic bacteria; volatiloma; phenolic compounds.

1 INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma das frutas mais cultivadas (PRAT et al., 2014; FAO, 2019). A composição nutricional dos pseudofrutos, propriedades benéficas do produto para a saúde humana, além de uma complexa composição de compostos voláteis responsáveis por seu sabor promovem grande apreciação da fruta (DIAMANTI et al., 2012; TODESCHINI et al., 2018).

Entretanto, sendo uma cultura extremamente demandante em termos nutricionais do solo, a produção de morangos é baseada no uso extensivo de fertilizantes químicos em vários estágios do ciclo, o que aumenta custos de produção e pode causar impactos ambientais (GLIESSMAN, 2000; PARDO et al., 2009).

Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento pode apresentar-se como uma estratégia de produção, sobretudo auxiliando na diminuição do uso de fertilizantes químicos (ESITKEN et al., 2010; LOVAISA et al., 2015; ANDRADE et al., 2019), devido à capacidade desses organismos em produzir fitorreguladores, solubilizar fosfato, fixar nitrogênio biologicamente e realizar outras funções (PEREIRA et al., 2012; MARRA et al., 2012; FELESTRINO et al., 2017; ANDRADE et al., 2019), como o estímulo do metabolismo vegetal (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017).

Diferentes espécies bacterianas podem ser consideradas promotoras de crescimento de morango, induzindo aumento de matéria seca de plantas (PEDRAZA et al., 2010; TODESCHINI et al., 2018; MORAIS et al., 2019; ANDRADE et al., 2019). Entretanto, ainda que o efeito desses microrganismos sobre o crescimento de morango seja bem descrito, apenas trabalhos recentes evidenciam o efeito da inoculação dos mesmos sobre produtividade, qualidade e composição de pseudofrutos, sobretudo no que tange características sensoriais e nutricionais/nutracêuticas do produto (FLORES-FELIX et al., 2015; BONA et al., 2015; FLORES-FELIX et al., 2018; TODESCHINI et al., 2018; MORAIS et al., 2019).

De modo geral, bactérias promotoras de crescimento de plantas podem exercer efeito sobre teores de vitamina C, composição em fenólicos, sólidos solúveis e ácidos orgânicos em pseudofrutos de morango (FLORES-FELIX et al., 2015; TODESCHINI et al., 2018; FLORES-FELIX et al., 2018; MORAIS et al., 2019).

Estudos indicam que doçura e aroma são os indicadores de qualidade de morango mais importantes para os consumidores (COLQUHOUN et al., 2012). Açúcares e ácidos orgânicos são componentes determinantes para o aroma e o sabor dos pseudofrutos, regulando a doçura dos mesmos (PEREZ et al., 1997; KALLIO et al., 2000). Além disso, o aroma do morango é

determinado por uma mistura complexa de compostos orgânicos voláteis, o que também influencia diretamente o sabor dos pseudofrutos. Entre os compostos voláteis predominantes em morango, encontram-se ésteres, alcoóis, aldeídos, cetonas, furanonas e terpenóides (PRAT et al., 2014; TODESCHINI et al., 2018).

Trabalhos evidenciam que a inoculação com microrganismos promotores de crescimento pode induzir à mudanças no perfil de compostos voláteis de pseudofrutos de morango (TODESCHINI et al., 2018). Considerando-se que a percepção de consumidores com relação à qualidade nutricional e características sensoriais de frutas pode afetar as escolhas que fazem em consumi-las ou não, torna-se importante avaliar o efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal sobre características organolépticas de pseudofrutos de morango, sobretudo em um contexto em que o uso dessas bactérias enquanto inoculantes em campos produtivos apresenta grande potencial de aplicação.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito de cinco isolados bacterianos oriundos de folhas e raízes de morangueiro e selecionados *in vitro* e *in vivo* para a promoção direta de crescimento sobre a produção e a qualidade de pseudofrutos de morango.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e cultivo dos isolados

Os isolados utilizados neste trabalho foram obtidos em isolamento prévio a partir de folhas e raízes de morangueiro da cultivar Aromas, como descrito por Andrade (2017) e posterior seleção *in vitro* para a produção de auxina, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato e *in vivo* para promoção direta de crescimento de mudas de morango (artigo/capítulo 1).

Os isolados bacterianos foram reativados em meio ágar-nutriente (3g L^{-1} de extrato de carne, 5g L^{-1} de peptona, 15g L^{-1} de ágar). Para a produção de inoculantes, os isolados foram cultivados em meio caldo nutriente (3g L^{-1} de extrato de carne, 5g L^{-1} de peptona).

Em todos os testes, os isolados foram mantidos a 30°C para o crescimento, sendo que, quando cultivados em meio líquido, foram mantidos sob agitação constante de 120rpm em shaker sob as mesmas condições citadas acima.

O pH dos meios de cultura foi ajustado, quando necessário, para 6,8 - 7 com solução 1 mol L^{-1} de HCl ou NaOH e, em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2 Avaliação da influência da inoculação sobre a produtividade de pseudofrutos de morangueiro

Cinco isolados selecionados em testes de promoção direta de crescimento *in vitro* foram avaliados quanto ao seu efeito sobre a produção de morangueiro (com 10 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso contendo uma muda de morangueiro) e a qualidade de pseudofrutos de morango (com 3 repetições, sendo cada repetição composta por um vaso contendo uma muda de morangueiro) a partir de um ensaio conduzido em casa de vegetação sob delineamento inteiramente casualizado. Para esses ensaios, cada isolado foi considerado um tratamento, além dos tratamentos controle com adubação reduzida e sem inoculação de bactéria, com adubação completa e controle com a inoculação de *Azospirillum brasilense*. Em ambos os ensaios, mudas de morango da cultivar Aromas obtidas em cultura de tecidos foram cultivadas em substrato inerte composto de areia e vermiculita na proporção 1:1. Além disso, foi adicionado fosfato natural de Argélia com 29% de P_2O_5 e solubilidade igual a 2% em ácido cítrico ao substrato em todos os tratamentos. Para tanto, o fosfato foi calculado para o fornecimento de 260kg/ha de P_2O_5 (SBCS, 2004). O substrato foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 1 hora por três vezes, com 24 horas de diferença entre cada esterilização.

As mudas foram mantidas em vasos de volume igual a 5L de substrato e irrigadas a cada 2 dias com água destilada estéril. Além disso, a cada 5 dias foi aplicada solução nutritiva de Hoagland e Arnon (completa para o controle positivo e com 30% de nitrogênio e fósforo para os tratamentos com inoculação dos isolados bacterianos e controle negativo). A solução completa de Hoagland e Arnon (1950) utilizada para o tratamento sem inoculação + adubação completa foi composta de 1mLL⁻¹ de KH_2PO_4 (1mol/L), 5mLL⁻¹ KNO_3 (1mol/L), 5mLL⁻¹ de $Ca(NO_3)_2$ (1mol/L), 2mLL⁻¹ de $MgSO_4$ (1mol/L), 1mL de solução de micronutrientes (2,86gL⁻¹ de H_3BO_3 , 1,81gL⁻¹ $MnCl_2$, 0,22gL⁻¹ de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,08 gL⁻¹ de $NaMoO_4 \cdot 4H_2O$) e 1mL de Fe-EDTA (24, 1gL⁻¹ de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 25,1gL⁻¹ de EDTA). A composição da solução com reduzida adição de nitrogênio e fósforo (30% da composição total) consistiu na substituição de KH_2PO_4 , KNO_3 e $Ca(NO_3)_2$ por 5,7 mLL⁻¹ de KCl (1mol/L), 5mLL⁻¹ de $CaCl_2$ (1mol/L), 0,3 mLL⁻¹ de KH_2PO_4 (1mol/L) e 3mLL⁻¹ de NH_4NO_3 (1,5mol/L) (HERNÁNDEZ, 2015).

O inoculo bacteriano foi previamente preparado pelo cultivo dos isolados selecionados nos testes *in vitro* de promoção de crescimento em meio caldo nutriente a 30°C sob agitação constante de 120 rpm durante 48 horas e posterior ajuste da concentração celular para 1×10^8

células/mL (densidade óptica de 0,5 a um comprimento de onda de 600nm mensurada em espectrofotômetro, de acordo com a escala de Mc Farland).

Ao final do ciclo da cultura (8 meses), foram avaliadas variáveis relacionadas à produção de morango, sendo elas matéria fresca de pseudofrutos produzidos/planta, número de pseudofrutos/planta, matéria fresca/pseudofruto, além da qualidade nutricional dos pseudofrutos.

2.3 Avaliação da composição bioquímica de pseudofrutos oriundos de plantas inoculadas e não inoculadas

Visando investigar o efeito da inoculação de bactérias promotoras de crescimento na qualidade de pseudofrutos de morango, foram realizadas avaliações de pH, acidez titulável, sólidos solúveis, concentração de ácido ascórbico (vitamina C), e de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

O teor de sólidos solúveis foi determinado em refratômetro digital (Atago PR 101) e os resultados foram expressos em porcentagem (AOAC, 2012).

A avaliação de acidez titulável foi realizada a partir da diluição de homogenato de pseudofruto (2g para cada planta) em água deionizada (20mL). As amostras foram, então, centrifugadas a 10000rpm. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de pH por titulação com NaOH a 0,01M até o alcance do pH 8,1 em titulação. Resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico por unidade de matéria fresca e os resultados foram expressos em gramas de ácido cítrico por 100 gramas de polpa (AOAC, 2012).

O pH das amostras foi determinado a partir dos extratos utilizados para a determinação dos teores de sólidos solúveis. Com essa finalidade, as medições foram realizadas com potenciômetro (AOAC, 2012).

O teor de ácido ascórbico foi quantificado em homogenato de 2 g da polpa diluído com volume suficiente de ácido oxálico a 5% e posterior titulação com reagente de Tillman (2,6 diclorofenolindofenol de sódio a 0,2%) (AOAC, 2012).

O teor de compostos fenólicos presentes na polpa foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando-se como referência o ácido gálico. Com essa finalidade, as amostras foram extraídas em metanol e a leitura foi realizada a 720nm. A quantificação do teor de fenólicos foi realizada pela comparação dos resultados com uma curva padrão contendo 5, 10, 15, 20, 30 e 40 μ g.mL⁻¹ de ácido gálico (WHATERHOUSE, 2002).

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método DPPH, baseado na captura de radical orgânico. A determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH foi realizada a partir de extrato de 2g de polpa obtido com metanol e acetona e a quantificação foi realizada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 515nm e posterior comparação à uma curva-padrão com diferentes concentrações de DPPH (RUFINO et al., 2007).

2.4 Análise do perfil de fenólicos de pseudofrutos

Visando a análise do conteúdo de fenólicos em pseudofrutos de plantas inoculadas e não inoculadas, extratos foram preparados de acordo com metodologia proposta por Ramaiya et al (2013). Com essa finalidade, 2,5g de amostra foram homogeneizados em 20mL de metanol grau HPLC 70% (v/v) durante 1 hora em banho ultrassônico, à temperatura ambiente. Em seguida o extrato foi centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C e filtrado em papel filtro com porosidade de 14µm. Antes da análise, as amostras foram novamente filtradas em filtros de membrana com porosidade de 0,45µm. Análises para identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando um cromatógrafo Shimadzu (LC-10Ai, Shimadzu Corp., Japão) equipado com um sistema de detecção de UV (SPD-10A) a um comprimento de onda de 280 nm. Cromatogramas foram produzidos a partir da injeção de 20µL de amostra a um fluxo de 1mL/min em coluna C18, com fase móvel composta por 2% de ácido acético em água (solução A) e metanol/água/ácido acético (70:28:2%, v/v, solução B). O método de análise foi realizado da seguinte forma: 0,01 min- 0%B; 5min-20%B; 25min-40%B; 43min – 45%B; 50min- 80%B; 55min-0%B; 65min-STOP. Fenólicos presentes nas amostras foram identificados por comparação com curvas-padrão dos fenólicos ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, vanilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido *m*-cumárico, ácido *o*-cumárico, quercetina, ácido trans-cinâmico e rutina.

2.5 Análise do perfil de compostos voláteis de pseudofrutos

Compostos voláteis foram analisados a partir de extração em fase sólida (head space phase microextraction – HS SPME GC-MS). Com essa finalidade, amostras de 4g de pseudofrutos foram acondicionadas em tubos vials e voláteis foram extraídos com fibra PDMS/CAR/DVB (Polidimetilsiloxano/carboxeno/divinilbenzeno - Supelco, Pensilvania,

EUA). A extração foi realizada a uma temperatura de 40°C durante 30 minutos. O material foi desorvido no cromatógrafo a uma temperatura de 220°C durante 2 minutos.

O sistema cromatográfico foi equipado com uma coluna Rtx-5MS 30m x 0,25mm x 0,25µm (fase ligada, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano). Hélio foi utilizado como gás carreador a um fluxo de 1mL/min. O material foi injetado no aparelho no modo split 1:5, com uma rampa de temperatura variando de 40°C a 200°C a 4°C/minuto. A detecção do espectro de massas foi realizada em modo full scan de 45 a 600 m/z com ionização de elétrons a 70eV.

2.6 Análise estatística

Resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas no software R (R Core Team, 2019) pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de morango e qualidade de pseudofrutos

A produção de pseudofrutos (g/planta) e respectiva qualidade (pH, acidez titulável, composição de fenólicos, percentual de sólidos solúveis, composição em vitamina C e capacidade antioxidante) para cada tratamento foram avaliadas (tabela 1).

A produção de frutas foi significativamente influenciada pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados no tratamento com adubação mineral completa, com uma média de 351,83g fruta/planta. Plantas inoculadas com o isolado MET12M2, apesar de apresentarem produção 78,36% menor do que as do tratamento com adubação mineral completa diferenciaram-se de todos os outros tratamentos, com uma produtividade de 197,26 g de fruta/planta, sendo este o melhor tratamento entre os isolados bacterianos. Os tratamentos com inoculação dos isolados MKC2M3, MZT10M1 e MZT10M12 não diferiram do tratamento com 30% da composição em N e P da solução nutritiva e sem inoculação.

O número de frutas por planta foi significativamente influenciada pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados no tratamento com adubação mineral completa, com um número médio de pseudofrutos igual a 39,80/planta. Plantas inoculadas com os isolado MET12M2, MKC2M3, MLT8M19, MZT10M1 e com a

estirpe Ab-V5 (*Azospirillum brasilense*) apresentaram produção média de 25,60, 21,40, 21,20, 20,20 e 22,40 frutas/planta, respectivamente, diferenciando-se do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação. O tratamento com inoculação do isolado MZT10M12 não diferiu estatisticamente do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação.

Na mesma espécie vegetal, trabalhando com inoculação de *Bacillus* e *Pseudomonas*, Esitken et al (2010) observaram aumento muito expressivo da produtividade e no número de pseudofrutos por planta.

O peso de frutas (gramas/pseudofruto) foi significativamente influenciado pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados no tratamento com adubação mineral completa, com peso médio de 8,863g /fruta. Plantas inoculadas com o isolado MET12M2 apresentaram uma média de 7,813g/ pseudofruto produzido, diferenciando-se dos outros tratamentos com inoculação, porém sendo estatisticamente diferente do tratamento com adubação mineral completa. A inoculação com a estirpe Ab-V5 promoveu aumento do peso médio dos pseudofrutos para 6,071g/pseudofruto. A inoculação com os isolados MKC2M3, MZT10M1, MZT10M12 não promoveu diferença estatística em comparação ao tratamento com adubação reduzida e sem inoculação, no qual pseudofrutos apresentaram um peso médio de 3,306 g/pseudofruto para essa variável.

Em trabalhos com inoculação de bactérias dos gêneros *Pedobacter* e *Bacillus* em morango, Morais et al (2019) observaram aumento no peso de pseudofrutos, bem como diferenças no formato de pseudofrutos e no comprimento. Entretanto, esses resultados foram observados apenas para bactérias do gênero *Pedobacter*. Bactérias do gênero *Bacillus* induziram diminuição do peso de pseudofrutos e de sua espessura. Resultados muito semelhantes foram observados no presente trabalho, quando diferentes isolados promoveram diferentes respostas com relação à produção de pseudofrutos, demonstrando que o efeito de bactérias promotoras de crescimento sobre a produção de pseudofrutos é estirpe-dependente. Assim como Morais et al (2019), Todeschini et al (2018) também observaram que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento promoveu aumento na produção e tamanho de pseudofrutos.

No presente trabalho, com apenas 30% do fornecimento em nitrogênio e fósforo, a inoculação do isolado MET12M2 induziu relevante aumento de produção e número de pseudofrutos por planta, além do aumento do peso de frutos.

Tabela 1 - Produtividade e qualidade de pseudofrutos oriundos de mudas de morango inoculadas ou não com bactérias endofíticas selecionadas *in vitro* para a promoção direta de crescimento vegetal.

| Tratamento | Produção de pseudofrutos | | | | Qualidade de pseudofrutos | | | | |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|---------|---------------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|--|
| | Produção (g)* | Número de frutas/planta* | Peso (g)/fruta* | pH* | Sólidos solúveis (%)* | Ácido cítrico (%)* | Vitamina C (mg/ 100g de morango)* | Fenólicos (mg/100g morango)* | Atividade antioxidante (g polpa para reduzir 1g DPPH)* |
| Adubação mineral completa | 351,83 a | 39,80 a | 8,863 a | 3,417 a | 9,333 a | 1,067 b | 89,042 c | 252,012 d | 220,081 b |
| 30% de N e P | 43,56 d | 13,70 c | 3,306 e | 3,450 a | 7,00 b | 1,032 b | 120,436 a | 340,29 a | 143,020 a |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | 134,00 c | 22,40 b | 6,071 c | 3,403 a | 9,00 a | 1,054 b | 97,891 b | 267,745 c | 228,811 b |
| MET12M2 | 197,26 b | 25,60 b | 7,813 b | 3,317 a | 9,00 a | 1,084 b | 90,703 c | 268,846 c | 159,005 a |
| MKC2M3 | 76,05 d | 21,40 b | 3,653 e | 3,463 a | 7,667 b | 1,037 b | 42,436 d | 316,696 b | 122,651 a |
| MLT8M19 | 108,41 c | 21,20 b | 5,258 d | 3,360 a | 7,333 b | 1,144 a | 115,261 a | 348,035 a | 114,870 a |
| MZT10M1 | 55,92 d | 20,20 b | 2,831 e | 3,373 a | 9,333 a | 1,182 a | 89,709 c | 313,31 b | 141,701 a |
| MZT10M12 | 55,71 d | 15,00 c | 3,707 e | 3,300 a | 8,00 b | 1,165 a | 94,230 b | 308,186 b | 258,181 b |

Legenda: * Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott a 5%.

3.2 Qualidade de pseudofrutos

A qualidade de pseudofrutos (Tabela 1) foi avaliada por diferentes métodos. O pH dos pseudofrutos não foi influenciado pela inoculação ou pelo fornecimento de nitrogênio e fósforo na forma mineral e solúvel ($p < 0,05$).

Todeschini et al (2018) observaram uma faixa de pH de 3,34 a 3,54 em pseudofrutos de morangueiro inoculado e não inoculado. Nesse trabalho, houve diminuição do pH de pseudofrutos após inoculação de plantas, assim como aumento da acidez titulável, o que somente foi observado no presente trabalho para os isolados MLT8M19, MZT10M1 e MZT10M12.

O teor em sólidos solúveis foi significativamente influenciado pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados no tratamento com adubação mineral completa, MET12M2, MZT10M1 e com a estirpe Ab-V5. Esses tratamentos apresentaram valores de 9,33%, 9,00%, 9,00% e 9,33% de teores de sólidos solúveis, respectivamente. Outros tratamentos não foram estatisticamente diferentes do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação, para o qual foi observado o valor médio de 7%.

Todeschini et al (2018), observaram diferença significativa entre os teores de sólidos solúveis em pseudofrutos de plantas de morangueiro inoculadas e não inoculadas, variando conforme as estirpes de *Pseudomonas* inoculadas, sendo uma evidência de que essa variável é estirpe-dependente. Resultados semelhantes foram observados por Morais et al (2019) após inoculação de bactérias dos gêneros *Pedobacter* e *Bacillus* na mesma espécie vegetal.

O teor em ácido cítrico foi significativamente influenciado pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados nos tratamentos com inoculação dos isolados MLT8M19, MZT10M1 e MZT10M12. Esses tratamentos apresentaram valores de 1,144%, 1,182%, 1,165%, respectivamente. Outros tratamentos não foram estatisticamente diferentes do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação, para o qual foi observado o valor médio de 1,032%.

Açúcares e ácidos orgânicos são os principais componentes solúveis dos pseudofrutos de morango (TODESCHINI et al., 2018). A relação entre açúcares e ácidos orgânicos afeta diretamente o aroma e o sabor dos mesmos (KALLIO et al., 2000). Açúcares, de modo geral, agem sobre a doçura do pseudofruto, podem ser precursores de compostos voláteis, (PRAT et al., 2014) ou estarem envolvidos na síntese de antocianinas (GOLLOP et al., 2002). No presente trabalho, a inoculação dos isolados MET12M2, MZT10M1 e da estirpe Ab-V5, bem

como a aplicação de adubação mineral completa favoreceram o aumento dos teores de sólidos solúveis, mas não dos teores de ácido cítrico, com excessão do isolado MZT10M1 que promoveu aumento dos dois parâmetros. Essas mudanças podem ter efeitos diretos no sabor dos pseudofrutos.

No que tange o teor de vitamina C (ácido ascórbico) dos pseudofrutos, observou-se os maiores valores para essa variável nos tratamentos com adubação reduzida e sem inoculação e com inoculação do isolado MLT8M19. Os valores encontrados nesses tratamentos foram de 120,436 e 115,261 mg de vitamina C/100g de morango. A inoculação com o isolado MZT10M12 e com a estirpe Ab-V5 não foram diferentes entre si, apresentando valores de 94,230 e 97,891 mg vitamina C/100g morango. Os tratamentos com adubação mineral completa e com inoculação dos isolados MET12M2 e MZT10M1 não apresentaram diferença significativa entre si, com valores de 89,042, 90,703 e 89,709 mg de vitamina C/100g de morango, respectivamente. A inoculação com o isolado MKC2M3 promoveu um conteúdo médio de 42,436 mg vitamina C/100g de morango, sendo este o menor valor observado entre os tratamentos.

Após inoculação de morango com isolados de *Pseudomonas*, Todeschini et al também (2018) não observaram diferenças nos conteúdos de ascórbico entre pseudofrutos de plantas inoculadas e não-inoculadas.

Aumentos do conteúdo de ácido orgânico já foram previamente descritos em morangos inoculados com *Rhizobium*, (FLORES-FELIX et al., 2015; FLORES-FELIX et al., 2018), mas o inverso também foi observado com o mesmo gênero bacteriano em pimenta (SILVA et al., 2014), demonstrando que o efeito da inoculação de plantas sobre o conteúdo de ácidos orgânicos é muito variável e estirpe-dependente.

O teor de fenólicos nos pseudofrutos foi significativamente influenciado pelos tratamentos ($p < 0,05$). Os maiores valores para essa variável foram observados nos tratamentos com inoculação do isolado MLT8M19 e com adubação reduzida e sem inoculação. Os tratamentos com inoculação dos isolados MZT10M1, MZT10M12 e MKC2M3 não foram estatisticamente diferentes entre si. Os tratamentos com inoculação do isolado MET12M2 e da estirpe Ab-V5 não foram diferentes entre si. Os menores valores para essa variável foram observados para o tratamento com adubação mineral completa.

Todeschini et al (2018) não observaram diferenças no conteúdo total de fenólicos entre plantas inoculadas e não inoculadas. No presente trabalho, maiores teores de fenólicos foram observados no tratamento com adubação reduzida e sem inoculação e no tratamento com inoculação do isolado MLT8M19.

Estima-se que a diminuição nos teores de ácido cítrico, vitamina C e fenólicos em tratamentos que promoveram maior produção deve-se à um efeito de diluição desses componentes em pseudofrutos, sobretudo em tratamentos que promoveram maior peso de pseudofrutos e maior produtividade de pseudofrutos por planta.

A capacidade antioxidante dos pseudofrutos (gramas de polpa necessários para reduzir 1g de DPPH) foi significativamente influenciada pelos tratamentos ($p < 0,05$). Pseudofrutos dos tratamentos com adubação reduzida e sem inoculação, com inoculação dos isolados MET12M2, MKC2M3, MLT8M19 e MZT10M1 apresentaram maior capacidade antioxidante representada pela menor quantidade de polpa necessária para reduzir 1g de DPPH. Para esses tratamentos, observaram-se valores de 143,020, 159,005, 122,651, 114,870 e 141,701, respectivamente. Os tratamentos com adubação mineral completa, com inoculação da estirpe Ab-V5 e com inoculação do isolado MZT10M12 não foram significativamente diferentes entre si.

Resultados muito semelhantes foram observados por Rahman et al (2018), em que a inoculação de *Bacillus* e *Paraburkholderia* em plantas de morango induziu o aumento da capacidade antioxidante de pseudofrutos.

A mudança da qualidade de pseudofrutos após inoculação com bactérias promotoras de crescimento já tem sido amplamente relatada para as variáveis avaliadas neste trabalho. Entretanto, efeitos sobre a qualidade dos frutos em morango variam muito conforme a espécie bacteriana e mesmo a estirpe testada (ESITKEN et al., 2010; FLORES-FELIX et al., 2015; FLORES-FELIX et al., 2018; TODESCHINI et al., 2018; MORAIS et al., 2019).

Plantas de tratamentos com inoculação receberam soluções nutritivas com apenas 30% da composição em nitrogênio e fósforo solúvel. Frutos do tratamento MET12M2 apresentaram resultados semelhantes (para teor de sólidos solúveis, teor de ácido cítrico, vitamina C) ou melhores (para teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante) do que frutos oriundos de plantas que receberam solução nutritiva completa, evidenciando seu potencial para aplicação na cultura.

3.3 Perfil de fenólicos em pseudofrutos

O perfil de fenólicos de pseudofrutos foi significativamente ($p < 0,05$) influenciado pelos tratamentos (tabela 2). Entre os compostos, foram identificados ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, vanilina, ácido *p*-cumárico e resviratrol. Maiores valores de ácido gálico foram encontrados no tratamento com adubação reduzida/sem inoculação ($1,77 \times 10^{-3}$

⁵mol/L), outros tratamentos não foram diferentes entre si. Concentrações mais expressivas de catequina foram observadas nos tratamentos com adubação completa ($1,36 \times 10^{-4}$ mol/L) e com adubação reduzida/sem inoculação ($1,082 \times 10^{-4}$ mol/L). Menores valores para a mesma variável foram observados nos tratamentos com inoculação do isolado MET12M2 e Ab-V5. No que tange o ácido clorogênico, a maior concentração em pseudofrutos foi obtida no tratamento com inoculação do isolado MLT8M19 ($3,20 \times 10^{-5}$ mol/L). Não foi observado ácido caféico na composição de pseudofrutos do tratamento com adubação reduzida/sem inoculação e os maiores valores para essa variável foram observados nos tratamentos com adubação completa ($1,94 \times 10^{-4}$ mol/L) e com inoculação da estirpe Ab-V5 ($2,21 \times 10^{-4}$ mol/L) e dos isolados MET12M2 ($2,13 \times 10^{-4}$ mol/L) e MLT8M19 ($2,22 \times 10^{-4}$ mol/L). Vanilina foi encontrada apenas no tratamento com adubação reduzida/sem inoculação na concentração de $6,58 \times 10^{-6}$ mol/L. Maiores concentrações de ácido *p*-cumárico foram observadas nos tratamentos com inoculação dos isolados MKC2M3 e MLT8M19 ($1,92 \times 10^{-6}$ mol/L para ambos). Resveratrol apenas foi obtido em pseudofrutos dos tratamentos com adubação reduzida/sem inoculação e com inoculação dos isolados MET12M2, MLT8M19, MZT10M1 e MZT10M12, entretanto as concentrações observadas em pseudofrutos do tratamento controle foram maiores ($1,25 \times 10^{-5}$ mol/L) do que o observado para as concentrações de pseudofrutos oriundos de plantas inoculadas. Resultados de quantificação de fenólicos estão de acordo com o observado neste trabalho para fenólicos totais.

Bactérias promotoras de crescimento podem apresentar diferentes efeitos sobre o perfil de fenólicos de pseudofrutos de morango. Trabalhando com a inoculação de *Rhizobium* e *Phyllobacterium* em morango, Flores-Félix et al (2018) observaram aumento de ácido *p*-cumárico e antocianina em pseudofrutos oriundos de plantas inoculadas com *Phyllbacterium*, porém o inverso foi observado em pseudofrutos oriundos de plantas inoculadas com *Rhizobium*. Nesse mesmo trabalho, a inoculação de bactérias promoveu significativa diminuição do conteúdo de catequina em pseudofrutos.

Tabela 2 - Compostos fenólicos em morangos oriundos de plantas inoculadas e não inoculadas com bactérias promotoras de crescimento

| Composto | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Ácido gálico | 8,8 x 10 ⁻⁶ b | 1,77 x 10 ⁻⁵ a | 8,7x10 ⁻⁶ b | 7,3x10 ⁻⁶ b | 9,0x10 ⁻⁶ b | 8,6x10 ⁻⁶ b | 8,1 x10 ⁻⁶ b | 1,03x10 ⁻⁵ b |
| Catequina | 1,36 x 10 ⁻⁴ a | 1,082x10 ⁻⁴ b | 1,18x10 ⁻⁵ e | 1,12x10 ⁻⁵ e | 1,82x10 ⁻⁵ d | 2,85x10 ⁻⁵ c | 3,63x10 ⁻⁵ d | 2,35x10 ⁻⁵ d |
| Clorogênico | 4,8x 10 ⁻⁶ c | 9,8x 10 ⁻⁶ c | 5,0x 10 ⁻⁶ c | 4,7x 10 ⁻⁶ c | 8,8x 10 ⁻⁵ c | 3,20 x10 ⁻⁵ a | 1,51 x10 ⁻⁵ b | 6,7x 10 ⁻⁶ c |
| Caféico | 1,94 x 10 ⁻⁴ a | - | 2,21x 10 ⁻⁴ a | 2,13x 10 ⁻⁴ a | 1,73x 10 ⁻⁴ b | 2,22x 10 ⁻⁴ a | 1,53x 10 ⁻⁴ b | 1,35x 10 ⁻⁴ b |
| Vanilina | - | 6,58 x10 ⁻⁶ a | - | - | - | - | - | - |
| <i>p</i> -cumárico | 1,53x 10 ⁻⁶ b | 1,42x 10 ⁻⁶ b | 1,72x 10 ⁻⁶ b | 1,60x 10 ⁻⁶ b | 1,92x 10 ⁻⁶ a | 1,92x 10 ⁻⁶ a | 1,64x 10 ⁻⁶ b | 1,60x 10 ⁻⁶ b |
| Resveratrol | - | 1,25 x10 ⁻⁵ a | - | 0,43x10 ⁻⁶ c | - | 0,53x10 ⁻⁶ b | 0,62x10 ⁻⁶ b | 0,41x10 ⁻⁶ c |

Legenda: T1= tratamento com adubação completa; T2 = tratamento com adubação nitrogenada e fosfatada reduzida em 70%/sem inoculação; T3= inoculação do isolado Ab-V5; T4= inoculação do isolado MET12M2; T5 = inoculação do isolado MKC2M3; T6= inoculação do isolado MLT8M19; T7 = inoculação do isolado MZT10M1; T8 = inoculação do isolado MZT10M12. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não se diferenciam entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

3.4 Mudanças no volatiloma de pseudofrutos

Análise de volatiloma de pseudofrutos oriundos de plantas inoculadas com BPCP e não inoculadas indicou a presença de 56 moléculas (tabela 3), identificadas pela comparação entre o espectro de massa experimental e o teórico de compostos presentes na biblioteca Nist 2,0 e entre o índice de retenção obtido no trabalho e o índice de retenção teórico para as mesmas moléculas em coluna DB-5. Essas moléculas pertencem a diferentes grupos químicos, sendo eles ésteres (39%), alcoóis (22%), alcanos (11%), hidrocarbonetos aromáticos (9%), cetonas (3,7%), ácidos carboxílicos (3,7%), furanos (3,7%), aldeídos (3,7%), éter (1,8%) e amônio quaternário (1,8%). O perfil de voláteis em morango encontrado neste trabalho é comparável ao observado por Todeschini et al (2018) para a mesma espécie vegetal, com a predominância de ésteres e alcoóis entre as moléculas identificadas.

Observa-se um perfil de voláteis muito variados entre pseudofrutos dos diferentes tratamentos. Em pseudofrutos do tratamento com adubação completa, foram observados 41 compostos voláteis diferentes. Pseudofrutos inoculados com os isolados Ab-V5 e MET12M2 apresentaram ambos 32 compostos voláteis. Pseudofrutos inoculados com outros isolados apresentaram entre 19 e 22 compostos voláteis e pseudofrutos do tratamento controle com adubação reduzida e sem inoculação apresentaram 22 compostos voláteis. Pseudofrutos oriundos de plantas dos tratamentos com adubação completa e inoculação com os isolados Ab-V5 e MET12M2 apresentaram maior percentagem de ésteres, alcoóis e alcanos em sua composição. Pseudofrutos dos tratamentos com adubação, inoculação da estirpe Ab-V5 e do isolado MET12M2 apresentaram 53,14, 51,81 e 33,33% de sua composição de voláteis em ésteres, respectivamente. Pseudofrutos dos tratamentos controle com adubação reduzida/sem inoculação e dos tratamentos com inoculação de outros isolados apresentaram maior representatividade de alcanos e alcoóis em sua composição, sendo que pseudofrutos do tratamento controle com adubação reduzida/sem inoculação apresentaram apenas 11,54% de sua composição de voláteis em ésteres.

O efeito de modulação da produção de compostos voláteis em resposta à inoculação de bactérias promotoras de crescimento já é descrito para a cultura do morango (TODESCHINI et al., 2018), com resultados muito similares ao observado neste trabalho.

Tabela 3 - Volatiloma de morangos oriundos de plantas inoculadas e não inoculadas com bactérias promotoras de crescimento.

| Composto | Grupo químico | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
|--------------------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Etanol | Álcool | 2,39 | 5,85 | 13,99 | 8,95 | 2,27 | 2,81 | 3,00 | 4,69 |
| Acetona | Cetona | 1,39 | 3,46 | 1,61 | 1,10 | 1,41 | 1,92 | 1,84 | 2,04 |
| Metiloxirano | Eter | 0,63 | | | | | | | |
| Diclorometano | Alcano | 2,61 | 2,56 | | 2,37 | 4,30 | 3,52 | 3,66 | 2,51 |
| Etano, 1,1'- oxibis- | Éter | 0,64 | | 2,67 | 2,57 | | | | 3,96 |
| 2-Metoxi-2-metilpropano | Alcano | 0,13 | | | 0,57 | 0,20 | 0,30 | 0,32 | 0,23 |
| 3-metilpropano | Alcano | | | | | 0,72 | 0,64 | 0,62 | |
| 3,3-dimetil-2-butanol | Álcool | 0,36 | | | | | | | |
| Ácido acético | Ácido carboxílico | 0,62 | | 0,60 | 0,42 | | | | 1,00 |
| Hexano | Alcano | 16,25 | 22,62 | | 16,76 | 35,74 | 33,98 | 37,64 | 23,54 |
| 2-metilbutanal | Aldeído | 1,73 | 0,80 | 0,58 | 2,03 | | 0,68 | | |
| Etil éster de ácido acético | Éster | 0,95 | 3,11 | 33,24 | 20,01 | 0,54 | 0,88 | 4,74 | 32,15 |
| Triclorometano | Alcano | 7,22 | 7,23 | 0,70 | 8,02 | 27,51 | 17,23 | 23,07 | 13,87 |
| 4-metil-1-pentanol | Álcool | 0,38 | 0,33 | | | | | 0,93 | 0,66 |
| Metil-ciclopentano | Alcano | 0,41 | | | 0,85 | 1,10 | 1,30 | 1,37 | 1,18 |
| Pentanona | Cetona | | 0,64 | | | | 0,37 | | |
| Etil éster de ácido propanóico | Éster | 12,17 | | 0,50 | | | | | |
| Metilbutirato | Ácido carboxílico | 3,98 | 1,50 | 2,67 | | | | | |
| Metil éster de ácido butanóico | Éster | 0,32 | | 1,78 | 3,05 | 1,36 | 5,06 | 2,41 | 1,59 |

Legenda: T1 = tratamento com adubação completa; T2= tratamento com adubação nitrogenada e fosfatada reduzida em 70%/sem inoculação; T3= inoculação do isolado Ab-V5; T4= inoculação do isolado MET12M2; T5= inoculação do isolado MKC2M3; T6= inoculação do isolado MLT8M19; T7= inoculação do isolado MZT10M1; T8= inoculado do isolado MZT10M12.

Tabela 3 - Volatiloma de morangos oriundos de plantas inoculadas e não inoculadas com bactérias promotoras de crescimento (continuação)

| Composto | Grupo químico | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
|--|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Metil éster de ácido butanóico | Éster | | | 1,43 | | | | | |
| 3-metil-1-butanol | Álcool | 8,60 | 0,94 | 1,70 | 0,97 | | | | |
| Butil éster de ácido cloroacético | Éster | | | 0,57 | | | | | |
| Hexano | Alcano | | | 0,50 | | | | | |
| Metil éster de ácido 2-metilbutanóico | Éster | 6,75 | 2,82 | | | | | | |
| | Hidrocarboneto | | | | | | | | |
| Metilbenzeno | aromático | 2,30 | | 3,13 | 5,56 | 9,29 | 6,05 | 5,22 | 1,40 |
| Etil éster de ácido butanóico | Éster | 0,38 | | 1,05 | 2,43 | 0,81 | 2,98 | 1,22 | 1,29 |
| Butil ester de ácido acético | Éster | 0,93 | | 0,36 | | | | | |
| 1-metiletil ester de ácido butanóico | Éster | | 2,69 | | | | | | |
| Etil éster de ácido 2-metil butanóico | Éster | | 1,55 | | | | 0,75 | | |
| 2-hexenal | Aldeído | | 0,82 | | | | | | |
| 2-Hexen-1-OL, (E)- | Álcool | 0,85 | 1,94 | | | | | | |
| Ciclohexanol | Álcool | 0,41 | 38,14 | 1,33 | | | | | |
| Hexanol | Álcool | | | 0,63 | 1,16 | 1,38 | 2,11 | 1,85 | 0,82 |
| 3-metilbutil éster de ácido acético | Éster | 6,07 | 0,61 | 7,70 | 1,38 | | | | 1,48 |
| | Hidrocarboneto | | | | | | | | |
| Etenilbenzeno | aromático | 0,24 | | 11,52 | 10,01 | 7,71 | 9,25 | 5,20 | 2,56 |
| Metil éster de ácido hexanóico | Éster | 0,66 | | 1,05 | 2,46 | 1,37 | 4,60 | 3,66 | 0,76 |
| Biciclo [3.1.0]Hex-2-eno, 2-metil-5-(1-metiletil)- | Hidrocarboneto aromático | 0,95 | | | 0,19 | 0,38 | 0,24 | | |
| N-benzilideno-Dimetilamonio clorido | Amônio quaternário | 1,57 | | | | | | | |

Legenda: T1 = tratamento com adubação completa; T2= tratamento com adubação nitrogenada e fosfatada reduzida em 70%/sem inoculação; T3= inoculação do isolado Ab-V5; T4= inoculação do isolado MET12M2; T5= inoculação do isolado MKC2M3; T6= inoculação do isolado MLT8M19; T7= inoculação do isolado MZT10M1; T8= inoculado do isolado MZT10M12.

Tabela 3 - Volatiloma de morangos oriundos de plantas inoculadas e não inoculadas com bactérias promotoras de crescimento (continuação)

| Composto | Grupo químico | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
|--|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Butilbutanoato | Éster | 7,79 | 0,76 | | | | | | |
| Butil éster de ácido butanóico | Éster | 1,74 | | 1,47 | | 1,35 | | | |
| Etil éster de ácido hexanóico | Éster | 0,44 | | 1,43 | 2,26 | 0,96 | 2,68 | 0,98 | 0,72 |
| 2,5-Ciclohexadieno-1-ácido carboxílico, 1-metil, metil éster | Éster | | | | 0,14 | | | | |
| Hexil éster de ácido acético | Éster | 0,94 | | 0,59 | 1,09 | | 1,12 | | 0,79 |
| Para-cimeno | Hidrocarboneto aromático | | | | 0,35 | | | | |
| L-limoneno | Hidrocarboneto aromático | 0,62 | | | 0,43 | | | | |
| 4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona | Furano | 2,10 | 0,92 | 0,73 | | | | | |
| 1-octanol | Álcool | | 0,69 | 1,53 | 0,59 | | | | |
| Benzenetanol | Álcool terpênico | | | 1,22 | 0,66 | | | | |
| 3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol (Linalol) | Álcool terpênico | 0,94 | | 2,39 | 1,46 | 1,18 | 1,52 | 1,52 | 1,20 |
| Benzenetanol | Álcool terpênico | | | | | | | | 1,55 |
| Mirtenol | Álcool terpênico | 0,42 | | | 0,35 | 0,44 | | | |
| Octil éster de ácido acético | Éster | 1,23 | | | | | | | |
| Etil éster de ácido decanóico | Éster | | | | 0,51 | | | | |
| Octil éster de ácido 2-metilpropanóico | Éster | 0,27 | | 0,40 | | | | | |
| Octil 2-metilbutanoato | Éster | 0,50 | | | | | | | |
| 2-metilbutil éster de ácido butanóico | Éster | 1,11 | | | | | | | |
| 5-Octildihidro-2(3H)-Furanona | Furano | | | | 0,54 | | | 0,84 | |
| Nerolidol | Álcool terpênico | | | 0,70 | 0,76 | | | | |
| 2-Etilhexil hexanoato | Éster | | | 0,24 | | | | | |

Legenda: T1 = tratamento com adubação completa; T2= tratamento com adubação nitrogenada e fosfatada reduzida em 70%/sem inoculação; T3= inoculação do isolado Ab-V5; T4= inoculação do isolado MET12M2; T5= inoculação do isolado MKC2M3; T6= inoculação do isolado MLT8M19; T7= inoculação do isolado MZT10M1; T8= inoculado do isolado MZT10M12.

Ésteres contribuem para notas de sabor frutado e fresco em morangos (LATRASSE, 1991). Esses compostos são os mais importantes em termos qualitativos para características de doçura e sabor frutado e floral em pseudofrutos dessa espécie vegetal (FORNEY et al., 2001). Em ensaios de Todeschini et al (2018), a inoculação de bactérias do gênero *Pseudomonas* promoveu aumento da concentração de ésteres em pseudofrutos, sugerindo que há efeito dos tratamentos com inoculação sobre o sabor doce-frutado em morango. Os mesmos resultados foram encontrados neste trabalho, em que se observou maior presença de ésteres em pseudofrutos dos tratamentos inoculados com os isolados MET12M2 e Ab-V5 e com adubação completa. Entretanto, no trabalho de Todeschini et al (2018), a inoculação de bactérias promotoras de crescimento induziu aumento significativo do éster 3-metil-1-butilacetato em pseudofrutos, o que não foi observado no presente trabalho.

Entre os ésteres, metil butanoato (metil éster de ácido butanóico), etil butanoato (etil éster de ácido butanóico), metil hexanoato (metil éster de ácido hexanóico), etil hexanoato (etil éster de ácido hexanóico), etil 2-metilbutanoato (etil éster de ácido 2-metil butanóico), hexil acetato (etil éster de ácido hexanóico) e (E)-hex-2-enil acetato são considerados os mais importantes para o sabor verde e frutado de morango (HIRVI; HONKANEN, 1982; AZODANLOU et al., 2003). No presente trabalho, à exceção do (E)-hex-2-enil acetato, todos os outros compostos voláteis citados foram observados em pseudofrutos. Pseudofrutos do tratamento com adubação completa não apresentaram em sua composição etil-2-metilbutanoato. Ao contrário, entre os ésteres citados, pseudofrutos oriundos do tratamento com adubação reduzida/sem inoculação apresentaram apenas etil-2-metilbutanoato. Pseudofrutos dos tratamentos com inoculação da estirpe Ab-V5 e do isolado MET12M2 apresentaram proporções consideráveis desses ésteres, à exceção do etil-2-metilbutanoato. Tratamentos com inoculação de outros isolados apresentaram todos os ésteres, à exceção de hexil acetato, etil-2-metilbutanoato e metil butanoato, os quais variaram entre os isolados.

Aldeídos podem contribuir para o sabor fresco de morango (ULRICH et al., 1997). Observa-se a presença de dois compostos pertencentes à esse grupo: 2-hexanal e 2-metilbutanal. Esses compostos foram observados em todos os tratamentos, à exceção dos tratamentos com inoculação dos isolados MKC2M3, MZT10M1 e MZT10M12. O mesmo foi observado por Todeschini et al (2018), em que aldeídos foram observados em pseudofrutos de todos os tratamentos, incluindo com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento. Apenas o tratamento com adubação reduzida/sem inoculação apresentou em sua composição 2-hexanal, relacionado com o sabor verde fresco de pseudofrutos (PRAT et al., 2014).

Alcoóis também têm sido descritos como uma classe de grande importância entre compostos voláteis de morango (TODESCHINI et al., 2018). Pseudofrutos dos tratamentos com adubação completa e com inoculação da estirpe Ab-V5 e do isolado MET12M2 apresentaram 14,35, 23,49 e 14,9% de sua composição de voláteis em alcoóis, respectivamente. Pseudofrutos do tratamento com adubação reduzida/sem inoculação apresentaram 45,95% de sua composição em voláteis de alcoóis. Entretanto, o sabor de pseudofrutos de morango é conferido principalmente por alcoóis terpenóides. Mais especificamente, o monoterpene linalol e o sesquiterpene nerolidol influenciam o sabor por aumentarem a presença de notas doces, florais, cítricas e verdes e o monoterpene mirtenol confere sabor amadeirado à fruta (AHARONI et al., 2004; BIANCHI et al., 2014). Neste trabalho, somente foi observada a presença de nerolidol em pseudofrutos dos tratamentos com inoculação dos isolados MET12M2 e Ab-V5. Mirtenol foi observado em pseudofrutos dos tratamentos com adubação completa, com inoculação do isolado MET12M2 e do isolado MKC2M3; e linalol foi encontrado em todos os tratamentos, com exceção do tratamento com adubação reduzida/sem inoculação. Além disso, hexanol, relacionado ao sabor verde fresco de pseudofrutos (PRAT et al., 2014), somente foi observado em tratamentos com inoculação de bactérias promotoras de crescimento. Todeschini et al (2018) também observaram que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento está diretamente relacionada à presença de alcoóis flavorizantes em pseudofrutos.

Apesar dos possíveis efeitos benéficos ao volatiloma de pseudofrutos, a inoculação com todos os isolados testados induziu à ausência de 4-Metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona em pseudofrutos, sendo essa molécula relacionada à notas de sabor caramelo em pseudofrutos (PRAT et al., 2014).

O presente trabalho é uma das poucas e recentes evidências de que a concentração de algumas moléculas em pseudofrutos de morango, sobretudo compostos voláteis, pode ser afetada pela inoculação de bactérias.

O uso de microrganismos testados neste trabalho em campos produtivos de morango pode contribuir para a diminuição da utilização de fertilizantes químicos e manutenção da produção, amenizando efeitos econômicos e ambientais dessa prática.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a inoculação de morangueiro com os isolados MET12M2, MKC2M3, MLT8M19, MZT10M1 e MZT10M12 induz mudanças na produção de morango e na qualidade dos pseudofrutos.

REFERÊNCIAS

- AHARONI, A.; GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F.W.A.; BERTEA, C.M.; SEVENIER, R.; SUN, Z. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. **Plant Cell**, v.16, p.3110-3131, 2004.
- ANDRADE, F.M. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento e inoculação em morangueiro**. 2017. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- ANDRADE, F.M.; PEREIRA, T.A.; SOUZA, T.P.; GUIMARÃES, P.H.S.; MARTINS, A.D.; SCHWAN, R.F.; PASQUAL, M.; DORIA, J. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological research**, v.223-225, p. 120-128, 2019.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 2002.
- AZODANLOU, R.; DARBELLAY, C.; LUISIER, J.; VILLETZAZ, J. ; AMADO, R. Quality assessment of strawberries (*Fragaria* species). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.715-721, 2003.
- BIANCHI, G.; LOVAZZANO, A.; LANUBILE, A.; MAROCCO, A. Aroma quality of fruits of wild and cultivated strawberry (*Fragaria* spp.) in relation to the flavor-related gene expression. **Journal of Horticultural Research**, v.22, p.77-84, 2014.
- BONA, E.; LINGUA, G.; MANASSERO, P.; CANTAMESSA, S.; MARSANO, F.; TODESCHINI, V.; COPETTA, A.; D'AGOSTINO, G.; MASSA, N.; AVIDANO, L.; GAMALERO, E.; BERTA, G. AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. **Mycorrhiza**, v.25, p.181-193, 2015.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v.12, n.3, 2017.
- COLQUHOUN, T.A.; LEVIN, L.A.; MOSKOWITZ, H.R.; WHITAKER, V.M.; CLARCK, D.G.; FOLTA, K.M. Framing the perfect strawberry: an exercise in consumer-assisted selection of fruit crops. **Journal of Berry Research**, v.2, p.45-61, 2012.
- DIAMANTI, J.; CAPOCASA, F.; BALDUCCI, F.; BATTINO, M.; HANCOCK, J.; MEZZETTI, B. Increasing strawberry fruit sensorial and nutritional quality using wild and cultivated germoplasm. **Plos One**, v.7, 2012.
- ESITKEN, A.; YILDIZ, H.E.; ERCISLI, S.; DONMEZ, M.F.; TURAN, M.; GUNES, A. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v.124, p. 62-66, 2010.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. **Production quantities by country: Average 2016 – 2017**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em 21 jan. 2019
- FELESTRINO, E.B.; SANTIAGO, I.F.; FREITAS, L.S.; ROSA, L.H.; RIBEIRO, S.P.; MOREIRA, L.M. Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaea*-

rhizosphere-host biological interface: a neglected modelo of bacterial prospection. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.172, 2017.

FLORES-FÉLIX, J.D.; VELÁZQUEZ, E.; GARCIA-FRAILE, P.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F.; SILVA, L.R.; RIVAS, R. *Rhizobium* and *Phyllobacterium* bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. **Food Research International**, 2018.

FLORES-FÉLIX, J.D.; SILVA, L.R.; RIVERA, L.P.; MARCOS-GARCIA, M.; GARCIA-FRAILE, P.; MARTINEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P.F.; VELÁZQUEZ, E.; ANDRADE, P.; RIVAS, R. Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: the case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. **Plos One**, v.10, 2015.

FORNEY, C.F. Horticultural and other factors affecting aroma volatile composition of small fruit. **Horticultural Technology**, v.11, p.529-538, 2001.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia** : processo ecológico em agricultura sustentável. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, 2000. 653p.

GOLLOP, R.; EVEN, S.; COLOVA-TSOLOVA, V.; PERL, A. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1397-1409, 2002.

HERNÁNDEZ, A.G. **Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão**. 2015. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station Circular**, 1950. 347p (Documentos).

HIRVI, T.; HONKANEN, E. The volatiles of two new strawberry cultivars, “Annelie” and “Alaska Pioneer”, obtained by backcrossing of cultivated strawberries with wild strawberries, *Fragaria vesca*, *rugen* and *Fragaria virginiana*, Z. Lebensm Forsch A. **European Food Research and Technology**, v.175, p.113-116, 1982.

LOVAISA, N.C.; GUERRERO-MOLINA, M.F.; DELAPORTE-QUINTANA, P.G.A.; SALAZAR, S.M. Response of strawberry plants inoculated with *Azospirillum* and *Burkholderia* at field conditions. **Rev. Agron. Noroeste Argent.**, v.35, n.1, p.33-36, 2015

KALLIO, H.; HAKALA, M.; PELKKIKANGAS, A.M.; LAPVETELAINEN, A. Sugars and acids of strawberry varieties. *European Food Research Technhnology*, v.212, p.81-85, 2000.

LATRASSE, A. Fruits III. In: DEKKER, H. **Volatile compounds in foods and beverages**. Nova York: Henke Maarse, 1991. p.333-387.

MARRA, L.M.; SOARES, C.R.F.S.; OLIVEIRA, S.M.; FERREIRA, P.A.A.; SOARES, B.L.; CARVALHO, R.F.; LIMA, J.M.; MOREIRA, F.M.S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, v.357, p. 289-307, 2012.

MORAIS, M.C.; MUCHA, A.; FERREIRA, H.; GONÇALVES, B.; BARCELAR, E.; MARQUES, G. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

PARDO, G.; CAVERO, J.; AIBAR, J.; ZARAGOZA, C. Nutrient evolution in soil and cereal yield under different fertilization type in dryland.. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.84, p.267-279, 2009.

PEDRAZA, R.O.; MOTOK, J.; TORTORA, M.I.; SALAZAR, S.M.; DÍAZ-RICCI, J.C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant Soil**, v.295, p.169-178, 2007.

PEREIRA, G.V.M.; MAGALHÃES, K.T.; LORENZETTI, E.R. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v.63, p. 405-417, 2012.

PRAT, L.; ESPINOZA, M.I.; AGOSIN, E.; SILVA, H. Identification of volatile compounds associated with de aroma of white strawberries (*Fragaria chiloensis*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p. 752-759, 2014.

RAHMAN, M.; SABIR, A.A.; MUKTA, J.A.; KHAN, M.M.A.; MOHI-UD-DIN, M.; MIAH, M.G.; RAHMAN, M.; ISLAM, T. Plant probiotic bacteria *Bacillus* and *Paraburkholderia* improve growth, yield and content of antioxidants in strawberry fruit. **Nature**, v.8, 2018.

RAMAIYA, S.D.; BUIANG, J.S.; ZAKARIA, M.H.; KING, W.S.; SHAFFIG, S.M.A. Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.5, p.1198-1205, 2013.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Embrapa, 2007. 127p (Comunicado Técnico).

SILVA, L.R.; AZEVEDO, J.; PEREIRA, M.J.; CARRO, L.; VELAZQUEZ, E.; PEIX, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B. Inoculation of the nonlegume *Capsicum annuum* (L.) with *Rhizobium* strains 1. Effect on bioactive compounds, antioxidant activity and fruit ripeness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p. 557-564, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10ed., Porto Alegre, 2004. 400p.

SYSTAT SOFTWARE Inc. **Sigmaplot for Windows, version 13**. 2006. Disponível em: <http://www.systat.com/products/sigmaplot/>.

TODESCHINI, V.; AITLAHMIDI, N.; MAZZUCCO, E.; MARSANO, F. ; GOSETTI, F. ; ROBOTTI, E. ; BONA, E.; MASSA, N.; BONNEAU, L.; MARENGO, E.; WIPF, D.; BERTA, G.; LINGUA, G. Impacto f beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality and volatilome. **Frontiers in Plant Science**, v.9, 2018.

URICH, D.; KOMES, D.; OLBRICHT-KAND-HOBERG, E. Diversity of aroma patterns in wild and cultivated *Fragaria* accessions. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, p.1185-1196, 2007.

WATERHOUSE, A.L. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R.E. **Current protocols in food analytical chemistry**. Nova York: John Wiley, 2002.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Botrytis cinerea* L. POR BACTÉRIAS PROMOTORAS
DE CRESCIMENTO ISOLADAS DE MORANGUEIRO

RESUMO

O morango (*Fragaria ananassa*, Duch.) é um pseudofruto de importância no mundo todo. Entretanto, muitos dos resultados de produção nacional da fruta têm sido alcançados pela aplicação de grandes quantidades de agrotóxicos para o controle de fitopatógenos, como o fungo *Botrytis cinerea* (mofo cinzento). Essa prática pode ocasionar muitos problemas ambientais e de saúde pública a médio e longo prazo, além de aumentar os custos de produção da fruta. Nesse contexto, bactérias promotoras de crescimento vegetal têm apresentado potencial de aplicação na produção agrícola porque possuem a capacidade de estimular o crescimento de plantas através de variados mecanismos, entre eles o controle biológico de fitopatógenos (mecanismo indireto de promoção de crescimento). Objetivou-se com esse trabalho, avaliar *in vitro* e *in vivo* o potencial de promoção indireta de crescimento de bactérias isoladas a partir de folhas e raízes de morangueiro. Foram realizados testes de antagonismo ao fungo *B. cinerea* pela técnica de confrontação direta e de produção de compostos antifúngicos voláteis pela técnica de placas invertidas. O efeito de seis isolados bacterianos que apresentaram maior potencial de controle biológico *in vitro* sobre o crescimento fúngico foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura. Seis isolados foram selecionados para testes de inibição do mofo cinzento em pseudofrutos de morango. Dos isolados obtidos, 132R, 44R, 69R, MET16M10R e MXT16M13R (obtidos a partir de raízes de morangueiro) e os isolados 26F, 29F, 47F, 65F, MQT16M1F, MTT9M2F (obtidos a partir de folhas de morangueiro) foram capazes de inibir mais de 65% do crescimento micelial do fungo por antagonismo direto e por compostos antifúngicos voláteis. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram a intensa degradação de hifas fúngicas quando na presença dos isolados bacterianos testados. Os seis isolados testados *in vivo* permitiram redução da incidência de mofo cinzento em pseudofrutos de morango em pós-colheita. Conclui-se que os isolados 24, 26, 29, 65, 132 e MQT16M1 apresentam potencial de aplicação para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em morango, destacando-se o isolado 29.

PALAVRAS-CHAVE: Bactéria promotora de crescimento de planta; microscopia eletrônica de varredura; antagonismo

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch.) is an important fruit worldwide. However, many of the results of national fruit production have been achieved by the application of large amounts of agrochemicals in the productive fields for the control of phytopathogens, such as the fungus *Botrytis cinerea* (gray mold). This practice can lead to many environmental and public health problems in the medium and long term, as well as increasing the costs of fruit production. In this context, plant growth-promoting bacteria have potential applications in agricultural production because they have the capacity to stimulate the growth of plants through different mechanisms, among them the biological control of phytopathogens (indirect mechanism of growth promotion). The aim of this work was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the potential of indirect growth promotion of bacteria isolated from leaves and roots of strawberry. Tests of antagonism to the fungus *Botrytis cinerea* were carried out by the technique of direct confrontation and production of volatile antifungal compounds by inverted Petri dish technique. The effect of six bacterial isolates that had the greatest potential for biological control *in vitro* on fungal growth was evaluated by scanning electron microscopy. Six isolates were selected for gray mold inhibition tests on strawberry fruits. From obtained isolates, 132R, 44R, 69R, MET16M10R and MXT16M13R (from strawberry roots) and 26F, 29F, 47F, 65F, MQT16M1F, MTT9M2F (from strawberry leaves) were able to inhibit more of 65% of fungal mycelial growth by direct antagonism and by volatile antifungal compounds. Images from scanning electron microscopy evidenced the intense degradation of fungal hyphae related to the presence of all tested bacterial isolates. All isolates tested *in vivo* allowed a decrease in the gray mold incidence in strawberry fruits. We conclude that 24, 26, 29, 65, 132 and MQT16M1 isolates present potential of application for biological control of *Botrytis cinerea* in strawberry, especially the 29 isolate.

KEYWORDS: Plant growth promoting bacteria; scanning electron microscopy; antagonism.

1 INTRODUÇÃO

O morango é uma fruta apreciada no mundo todo por suas características organolépticas e nutracêuticas (TACO, 2011; COELHO JUNIOR, 2016). Dados mais recentes da FAO indicam que a produção dessa fruta no mundo ultrapassa 9 milhões de toneladas, em uma área cultivada próxima a 400 mil hectares, sendo a mesma dispersa em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (FAO, 2019).

Entretanto, a fruta é altamente susceptível à fungos de pós-colheita. De todo o alimento produzido no mundo, 25 a 50% pode ser perdido durante esse período, principalmente devido à presença de microrganismos fitopatogênicos e condições de estocagem (NUNES, 2012). O fungo *Botrytis cinerea* tem sido apresentado como o segundo mais importante patógeno de plantas, sendo que as despesas para seu controle já ultrapassam 1 bilhão de euros por ano no mundo (DEAN et al., 2012).

Botrytis cinerea (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* (de Barry) Whetzel) é um fungo filamentososo que pode acometer e causar perdas em mais de 230 espécies vegetais pelo mundo. Os sintomas mais comuns estão relacionados à flores e frutos, mas podem ocasionar apodrecimento de brotos, tombamento e podridões em bulbos, colmos e raízes. Em frutos, como é o caso do morango, a patologia inicia-se com o aparecimento de manchas marrons, que se expandem até tomar o fruto, o qual apresenta uma coloração acinzentada com o tempo, bem como a cobertura característica do mofo-cinza. (JANAKA et al., 1997; MAAS, 1998; ELAD; STEWART, 2007).

Produtos com diferentes princípios ativos têm sido utilizados para o controle de *Botrytis cinerea*. Entretanto, já tem sido reportada a seleção e rápido desenvolvimento de genótipos de *Botrytis cinerea* resistentes à esses fungicidas (LEROCH et al., 2011; LEROCH et al., 2013; GRABKE et al., 2014; LOPES et al., 2017; AVENOT et al., 2018).

Com relação à esse tipo de produto, tem-se observado que grande parte dos agrotóxicos é perdida, sendo carregados para corpos d'água e para o solo, ocasionando contaminação ambiental, além de efeitos sobre organismos não-alvos e desbalanços no equilíbrio ecológico das espécies desses ecossistemas. Além disso, é importante ressaltar que esses produtos podem elevar os níveis de resíduos de agroquímicos no produto final (GLIESSMAN, 2000; GOULSON et al., 2015; PERSHINA et al., 2015; STUART; STUART; PIMENTEL, 2018; ESTEVE-TURRILLAS et al., 2018; CANG et al., 2018).

Portanto, o controle biológico de *B. cinerea* utilizando microrganismos tem se apresentado como uma alternativa interessante aos métodos de controle químico, sobretudo

devido aos efeitos mais brandos ao ambiente e à natureza não tóxica da fonte de controle (FERREIRA-SAAB et al., 2018; VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018; JIANG et al., 2015; BOLIVAR-ANILLO; GARRIDO; COLLADO, 2019).

A rizosfera é uma zona localizada na interface entre raiz e solo que se encontra sob influência de exsudatos radiculares, o que também a torna uma zona de intensa atividade, concentração e diversidade microbiana (VALÉ et al., 2005; BAIS et al., 2005). Nesse ambiente, é possível observar condições muito favoráveis ao crescimento das chamadas bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) (VESSEY, 2003; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), um grupo de microrganismos capaz de desenvolver interações benéficas com as plantas, podendo modular seu metabolismo e estimular a produtividade vegetal (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017; TODESCHINI et al., 2018; MORAIS et al., 2019).

Em geral, esses microrganismos podem controlar fitopatógenos por diversos mecanismos, os quais envolvem produção de β -1,3-glucanase, quitinase, celulase e pectinase (QUECINE et al., 2012; GEORGE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016), espécies reativas de oxigênio (ESMAEEL et al., 2019), ácido cianídrico (RODRIGUES et al., 2016), além de antibióticos e outros metabólitos antifúngicos (FERNANDO et al., 2005; ZHAO et al., 2017; ZHAO et al., 2018; BOLIVAR-ANILLO; GARRIDO; COLLADO, 2019), sideróforos (GEORGE et al., 2013; FELESTRINO et al., 2017) e da indução da defesa vegetal (QUECINE et al., 2012; DU et al., 2016; ZHAO et al., 2018; VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018; JIANG et al., 2018).

Especificamente no caso do fungo *B. cinerea*, muitas espécies de bactérias e promotoras de crescimento têm sido testadas com a finalidade de controle biológico, como as dos gêneros *Pseudomonas* (GAO et al., 2018) e *Bacillus* (KIM et al., 2013; JIANG et al., 2018; VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018; ESMAEEL et al., 2019). Entretanto, mais pesquisas são necessárias visando o eficiente controle biológico do mofo cinzento, sendo a utilização de bactérias uma potencial alternativa à aplicação de fungicidas.

Objetivou-se com esse trabalho a seleção de bactérias endofíticas de morangueiro para o controle biológico do mofo cinzento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo microbiano

Bactérias promotoras de crescimento utilizadas neste trabalho foram obtidas em isolamento prévio a partir de folhas e raízes de morangueiro da cultivar Aromas, como descrito por Andrade (2017).

Os isolados bacterianos foram reativados em meio ágar-nutriente (3g L^{-1} de extrato de carne, 5g L^{-1} de peptona, 15g L^{-1} de ágar). Para a produção de inoculantes, os isolados foram cultivados em meio caldo nutriente (3g L^{-1} de extrato de carne, 5g L^{-1} de peptona).

Em todos os ensaios, os isolados foram mantidos a 30°C para o crescimento, sendo que, quando cultivados em meio líquido, foram mantidos sob agitação constante de 120rpm em shaker sob as mesmas condições citadas acima.

Visando à realização dos testes de antagonismo e de produção de compostos voláteis contra *B. cinerea*, o fungo fitopatogênico foi cultivado em meio BDA (4g L^{-1} de infusão de batata desidratada, 20g L^{-1} de dextrose e 15g L^{-1} de ágar para um pH final de $5,6 \pm 0,2$) durante 7 dias a uma temperatura controlada de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz diária em estufa BOD.

O pH dos meios de cultura foi ajustado, quando necessário, com solução 1 mol L^{-1} de HCl ou NaOH e, em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

2.2 Teste de antagonismo

A capacidade de produzir metabólitos antifúngicos foi avaliada em placas de Petri, pelo método de competição dualizada/enfrentamento direto (adaptado de JASIM et al., 2016) em experimento contendo 6 repetições por tratamento, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição.

O isolado fúngico foi cultivado em meio BDA por 7 dias antes da montagem do experimento, ao passo que os isolados bacterianos foram cultivados em meio caldo nutriente, 2 dias antes da montagem do experimento.

Após a incubação (48 horas), foi ajustada a densidade óptica dos isolados bacterianos em espectrofotômetro para 0.5 a um comprimento de onda de 600nm e $10\mu\text{L}$ da suspensão bacteriana foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA. A suspensão foi espalhada em forma de uma linha central, a 4cm de cada extremidade da placa. Um disco de

aproximadamente 6 mm² do micélio fúngico previamente preparado foi adicionado em cada extremidade da placa, a 2 cm das mesmas.

Além das placas contendo os isolados bacterianos, foram cultivadas placas-controle contendo somente o fungo em meio BDA. Todos os tratamentos continham 6 repetições. As placas foram incubadas a 25°C e o halo de inibição do crescimento fúngico em direção à bactéria foi mesurado com paquímetro digital no momento em que o micélio das placas-controle atingiu a extremidade da placa.

2.3 Teste de inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* por compostos voláteis

A metodologia utilizada para a avaliação da capacidade de produção de compostos antifúngicos voláteis foi adaptada de Fernando et al (2005). Com a finalidade de avaliar os efeitos de possíveis compostos voláteis produzidos pelos isolados bacterianos sobre o fungo *Botrytis cinerea*, as bactérias foram cultivadas em meio caldo nutriente a 30°C sob agitação constante de 120 rpm durante 48 horas e a densidade óptica foi ajustada em espectrofotômetro para 0,5 a um comprimento de onda de 600nm.

Uma alíquota de 100µL da suspensão bacteriana foi adicionada em placas contendo meio de cultura agar-nutriente e espalhada. Simultaneamente, discos de aproximadamente 6mm² do micélio fúngico foram adicionados ao centro de outras placas contendo meio BDA. Placas de Petri contendo meio ágar-nutriente + bactérias repicadas foram invertidas imediatamente às placas contendo meio BDA+disco de micélio fúngico e as placas foram seladas rapidamente uma contra a outra com filme plástico.

As placas foram incubadas à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz diária, até que o micélio fúngico das placas contendo o fungo sem bactéria (controles) tocasse na extremidade da placa de Petri, momento no qual o diâmetro das colônias fúngicas foi mesurado com paquímetro digital em dois eixos ortogonais utilizando duas medidas diametralmente opostas. Todos os tratamentos foram compostos por 3 repetições, sendo cada placa considerada uma repetição.

2.4 Avaliação da inibição do crescimento fúngico por microscopia eletrônica de varredura

A partir dos testes *in vitro* de produção de compostos que possuem ação antifúngica, foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura para verificar os efeitos desses compostos sobre o micélio fúngico. Discos de 5mm de diâmetro foram coletados nas bordas da colônia fúngica em placas dos testes citados acima.

As análises de microscopia eletrônica foram conduzidas de acordo com protocolo sugerido por Bozzola e Russel (1999). Os discos coletados foram imediatamente fixados em solução Karnovsky modificada (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M), por um período mínimo de 24 horas. Para o preparo das amostras os discos fixados foram transferidos para uma solução-tampão de cacodilato (0,05M) e lavados por três vezes durante 10 minutos. Em seguida, os mesmos foram lavados em água destilada por três vezes e desidratados em soluções com concentrações crescentes de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Posteriormente, os discos foram levados à secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido em aparelho Balzers CPD 030; para posterior montagem em suportes de alumínio (stubs), quando foram cobertos com ouro (em evaporador Balzers SCD 050) para observação em microscópio eletrônico de varredura (LEO EVO 40). As imagens geradas foram gravadas e processadas no software Corel Photopaint de pacote Corel Draw X7, para preparação das pranchas.

2.5 Avaliação da inibição de *Botrytis cinerea* em pseudofrutos de morango

Além dos testes *in vitro*, foram realizados testes da capacidade de controle biológico de *Botrytis cinerea* pelos isolados bacterianos em pseudofruto. Nesses ensaios, os tratamentos utilizados foram os isolados bacterianos selecionados para a capacidade de controle biológico de *Botrytis cinerea* nos testes *in vitro* e um tratamento controle contendo somente o meio de cultura no qual as bactérias foram cultivadas.

O fungo *Botrytis cinerea* foi previamente cultivado em meio BDA a 25°C por 7 dias. Os isolados bacterianos foram crescidos em meio caldo nutriente durante 48 horas a 30°C sob agitação constante de 120rpm, como descrito na seção “cultivo microbiano”. A concentração de células bacterianas foi posteriormente ajustada para 1x10⁸ células/mL em espectrofotômetro (densidade óptica de 0,5 em comprimento de onda de 600nm, de acordo com a escala de Mc Farland).

Em seguida, 4 pseudofrutos de morango por repetição foram desinfetados exteriormente pela imersão em hipoclorito de sódio 2% durante 30 segundos e três posteriores lavagens em água destilada estéril. Os pseudofrutos de 3 cultivares diferentes (Albion, San Andreas e Monte Rey) foram, então, imersos nas suspensões de células bacterianas por 30 minutos e adicionados à papéis-filtro previamente esterilizados (a 121°C por 30 minutos) para a secagem. Posteriormente, foi adicionado um disco de 5mm de diâmetro do crescimento fúngico em cada pseudofruto e os mesmos foram mantidos em câmara úmida a 25°C e 80 a 90% UR até que os pseudofrutos do tratamento controle fossem completamente tomados pelo fungo fitopatogênico. Nesse momento, foi realizada a avaliação da incidência e severidade (em escala de notas) da doença, sendo que cada tratamento foi composto por 3 repetições. A escala de notas adotada para a avaliação da severidade da doença em pseudofrutos foi conduzida da seguinte forma: pseudofrutos sem sintomas da infecção fúngica receberam a nota 0, fungos com até 25% do pseudofruto tomado pelo fungo receberam a nota 1, pseudofrutos com cerca de 50% do pseudofruto tomado pelo fungo receberam a nota 2, pseudofrutos com cerca de 75% do pseudofruto tomado pelo fungo receberam a nota 3 e pseudofrutos completamente tomados pelo fungo receberam a nota 4. Os resultados foram expressos em índice de doença através da fórmula adaptada de Camili et al (2007):

$$ID (\%) = \{[(n1 \times 1) + \dots + (n4 \times 4)] \times (4 \times N)^{-1}\} \times 100$$

Onde:

$n1 \dots 4$ = nº de pseudofrutos infectados com a respectiva nota

N = nº total de pseudofrutos inoculados

2.6 Análise estatística

Experimentos *in vitro* foram conduzidos em um desenho completamente casualizado com seis (experimento de antagonismo) e três repetições (ensaio de produção de compostos voláteis) por tratamento (isolado). Um tratamento sem inoculação (sem bactérias) foi incluso em cada experimento como controle negativo. A inibição do crescimento micelial (%) foi calculada em relação ao tratamento controle. Isolados bacterianos foram comparados no software R (R Core Team, 2019) e diferenciados com base no teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em ensaios de inibição de *B. cinerea* pós-colheita, como os dados não atenderam aos pressupostos de homocedasticidade e normalidade da análise de variância, foram realizados testes não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar efeitos únicos dos tratamentos. Um teste pareado posthoc Dunn (5% de significância) usando um ajuste de Bonferroni foi realizado para determinar quais níveis da variável independente diferem um do outro. Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente de computação estatística R. Todos os processamentos e análises de dados, assim como os gráficos, foram executados no software R versão 3.4.3 (R Core Team 2019).

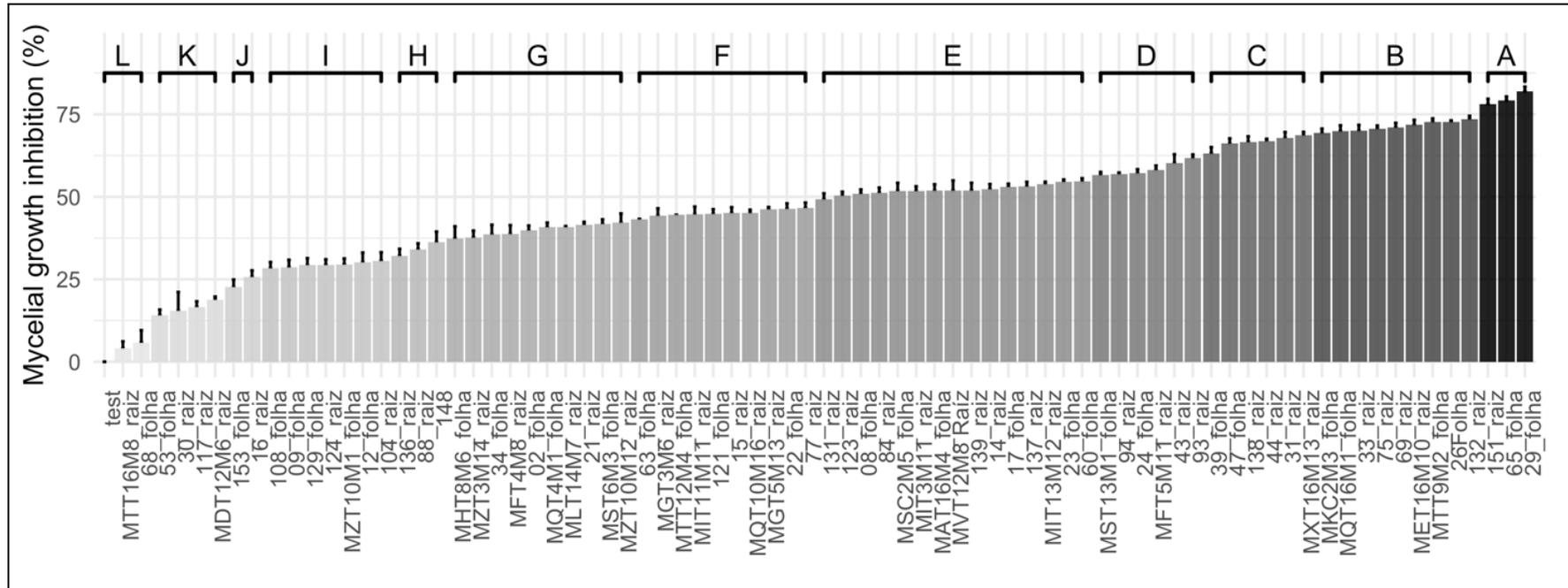
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados obtidos em testes de antagonismo evidenciam a capacidade dos isolados bacterianos em controlar o fungo *Botrytis cinerea* (Figura 1). Observou-se grande variação no crescimento fúngico quando na presença dos diferentes isolados, sendo que a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* variou entre 4,02 (para o isolado MTT16M8R) e 82% (para o isolado 29F). Os maiores valores de inibição do crescimento micelial foram observados nos tratamentos com os isolados 29F, 65F e 151R.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem apresentar capacidade de controle biológico de diferentes microrganismos. Em ensaios *in vitro* com bactérias do gênero *Pseudomonas*, George et al (2015) observaram capacidade de controle biológico por antagonismo direto *in vitro* e também inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Candida albicans*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani* e *Trichophyton rubrum* pelo extrato clorofórmico dos mesmos isolados bacterianos.

A inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* por bactérias promotoras de crescimento em ensaios *in vitro* de confronto direto tem sido amplamente descrita (KIM et al., 2013; ILHAN; AKGUN; KARABULUTA, 2013). A inibição de até 50% da incidência de mofo cinzento após a inoculação de bactérias das espécies *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas vesicularis* foi relatada por Ilhan, Akgun e Karabuluta (2013).

Figura 1 - Percentual de inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em teste de antagonismo por enfrentamento direto com bactérias promotoras de crescimento isoladas de folhas e raízes de morangueiro.



Médias apresentando a mesma letra não diferem-se pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Donmez et al (2011) observaram que isolados dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brevibacillus*, *Brevundomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Kurthia*, *Pantoea*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* foram todos capazes de inibir o crescimento de *Botrytis cinerea* em diferentes níveis. Nesse mesmo trabalho, melhores resultados foram obtidos em ensaios com bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*.

Ainda com bactérias do gênero *Bacillus*, Shternshis et al (2015) observaram controle de até 85,5% do crescimento de *Botrytis cinerea in vitro*. O mesmo foi observado por Andreolli et al (2019) com relação ao efeito de *Pseudomonas* sobre o crescimento de *Botrytis cinerea in vitro* e *in vivo* em ensaios com videiras.

Isolados de outros gêneros, como *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudoxanthomonas* e *Rhizobium* também têm sido relatados como eficientes para o controle do crescimento de *Botrytis cinerea in vitro* (ANDREOLLI et al., 2015).

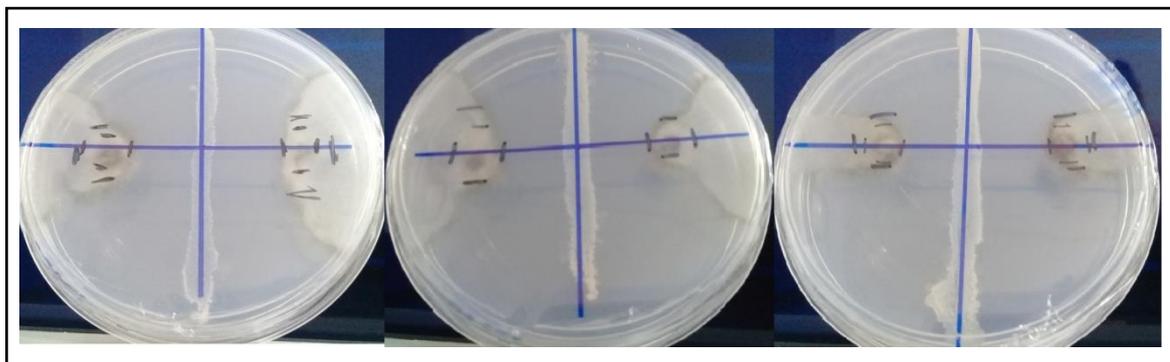
Com base em outros trabalhos realizados visando o controle biológico de *B. cinerea*, observa-se a grande diversidade de bactérias que apresentam efeito sobre esse fitopatógeno. No presente trabalho, diferentes níveis de inibição do fitopatógeno foram observados e variaram conforme isolado, indício de que essa é uma característica estirpe-dependente.

De acordo com Gao et al (2018), a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos por bactérias promotoras de crescimento pode estar relacionada à inibição da germinação de conídios, do alongamento do tubo germinativo e efeitos diretos sobre o crescimento micelial. Com relação à esse último efeito, esses autores observaram forte relação com danos intensos causados por bactérias na membrana plasmática dos fungos.

Visualmente, observou-se inibição direta ao crescimento micelial em direção aos isolados bacterianos (Figura 2). Não foi observada a inibição do crescimento da colônia do fungo na direção oposta do microrganismo. Esse resultado pode sugerir que a inibição crescimento micelial do fitopatógeno está associada à proximidade do patógeno ao isolado bacteriano, reforçando a possibilidade de produção de compostos inibitórios pelos isolados bacterianos testados.

Além disso, como ilustrado na Figura 2, o antagonismo desenvolvido pelos isolados bacterianos selecionados nos testes *in vitro* está associado à formação de uma linha de coloração marrom na extremidade do crescimento micelial que se encontra em direção à bactéria. Isso pode sugerir a excreção de compostos antifúngicos pelas bactérias, os quais afetam o crescimento do micélio em suas extremidades.

Figura 2 - Avaliação *in vitro* da produção de compostos antifúngicos por bactérias promotoras de crescimento isoladas a partir de raízes e folhas de morangueiro.



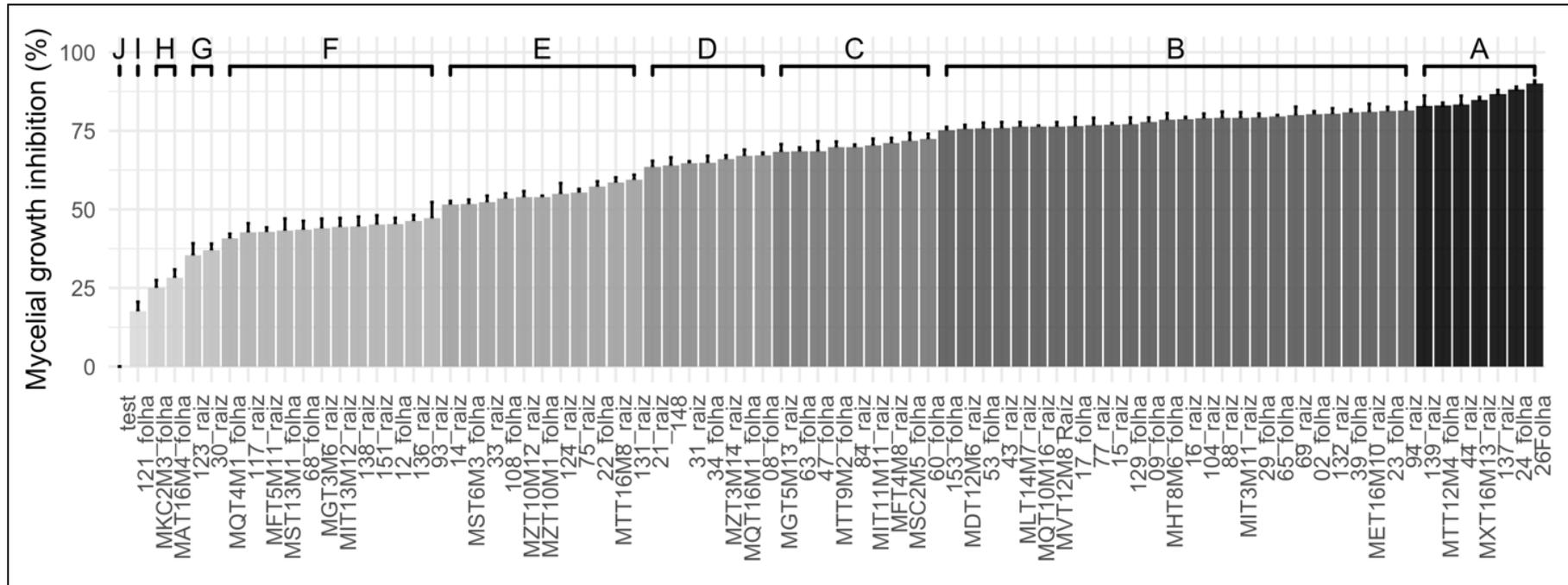
Microrganismos endofíticos possuem a habilidade de sintetizar uma gama muito diversificada de moléculas bioativas com efeitos sobre outros organismos, como inseticidas ou antibacterianos (DUTTA et al., 2014; HARDOIM et al., 2015).

A produção de compostos antifúngicos já é descrita para diferentes gêneros de bactérias promotoras de crescimento (ZHAO et al., 2017; ZHAO et al., 2018; BOLIVAR-ANILLO; GARRIDO; COLLADO, 2019). A partir do extrato livre de células de *Bacillus*, Jasim et al (2016) descreveram a capacidade de bactérias desse gênero em exsudar polipeptídeos como gentamicina, bacilomicina, iturina, fengicina e surfactina, todos com efeito antifúngico comprovado. Genes responsáveis pela produção desses metabólitos foram descritos no genoma de bactérias do gênero *Bacillus* por Koumoutsi et al (2004) e Toral et al (2018).

Além de polipeptídeos, a abordagem metabolômica permitiu a identificação e classificação de muitos compostos bacterianos antifúngicos (voláteis e não voláteis) nos mais diferentes grupos químicos, como hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, alcoóis, compostos aromáticos/benzenos, alquil, ácidos orgânicos, ésteres e éteres (FUJIMOTO, 2017; JASIM et al., 2016; GEORGE et al., 2015; YUAN et al., 2012; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2008; VESPERMANN; KAI; PECHULLA, 2007; FERNANDO et al., 2005).

Ensaio de placas sobrepostas também evidenciaram a capacidade dos isolados bacterianos em controlar o fungo *Botrytis cinerea* por compostos antifúngicos voláteis (Figura 3). Nesse ensaio, observou-se grande variação no crescimento fúngico quando na presença dos diferentes isolados (Figura 4). A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* variou entre 17,64% (para o isolado 121F) e 90,107% (para o isolado 26F). Os maiores valores de inibição do crescimento micelial foram observados nos tratamentos com os isolados 26F, 24F e 137R, MXT16M13R, 44R, MXT12M4F e 139R.

Figura 3 - Percentual de inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em teste de produção de compostos antifúngicos voláteis com bactérias promotoras de crescimento isoladas de folhas e raízes de morangoiro.



Médias apresentando a mesma letra não se diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade

Ensaio *in vitro* de produção de compostos voláteis evidenciaram inibição do crescimento de *B. cinerea* de mais de 90% e ensaios de antagonismo evidenciaram uma máxima inibição do crescimento de *B. cinerea* igual a 82%. Esses resultados podem indicar a ocorrência de uma interação diferente entre os microrganismos a nível metabólico nos dois ensaios, podendo a mesma ocorrer por rotas diferentes, inclusive.

Além disso, é possível que metabólitos voláteis exsudados tenham níveis diferentes de eficiência de controle em relação aos não voláteis e que a exsudação de voláteis seja aumentada ou que a exsudação de outros voláteis não induzidos nos testes de antagonismo seja estimulada devido à interação metabólica durante os ensaios de inibição de *B. cinerea* por compostos voláteis.

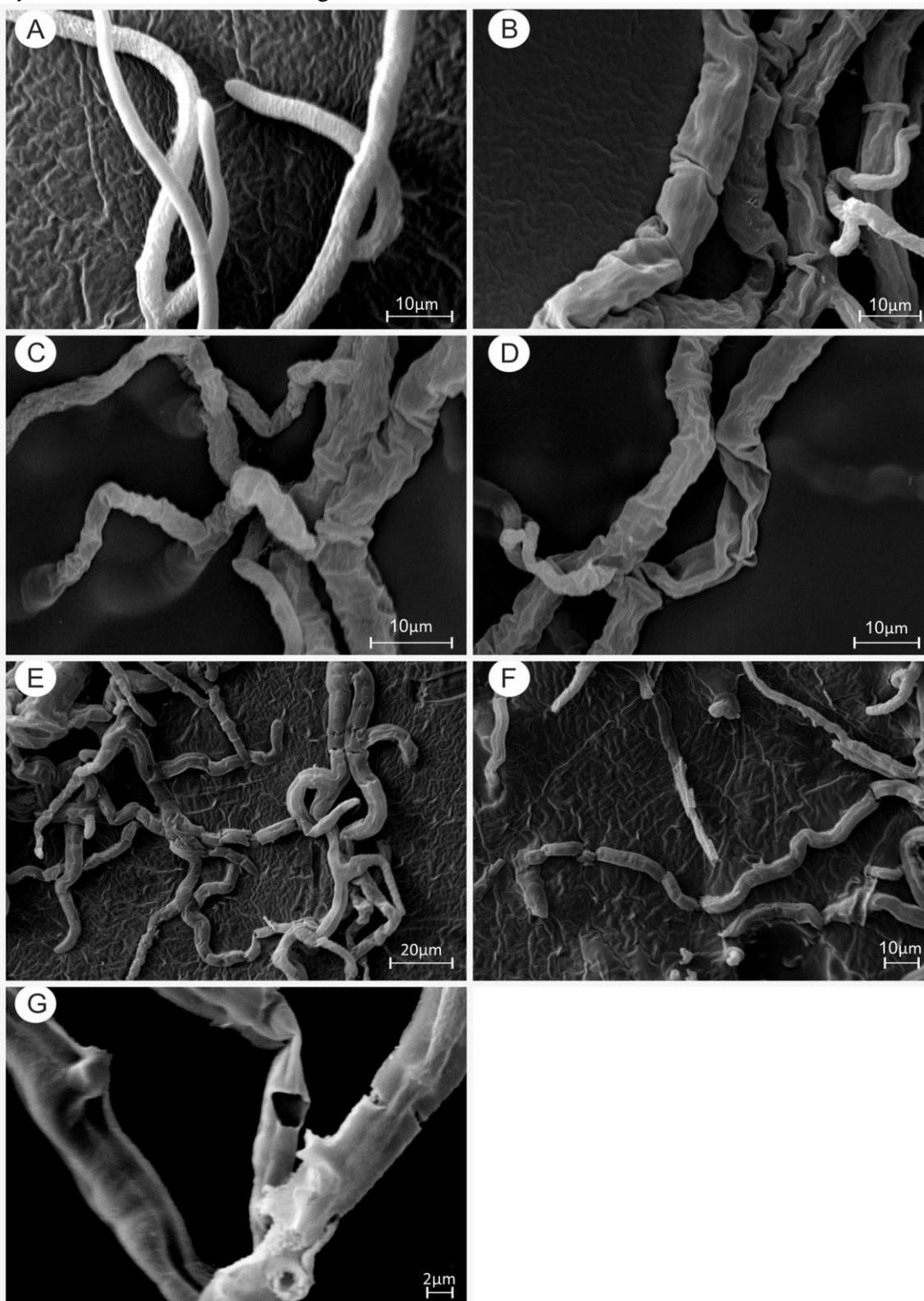
Bactérias têm sido descritas como produtoras de antimicrobianos voláteis, entre eles benzeno, alquil, cetona, alcoóis (YUAN et al., 2012; JASIM et al., 2016). O controle de *Botrytis cinerea* por bactérias promotoras de crescimento vegetal através da produção de compostos voláteis também já é relatado na literatura (VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018), evidenciando a importância da seleção *in vitro* de isolados bacterianos capazes de expressar essa característica.

No entanto, a natureza dos compostos voláteis exsudados provavelmente é um fator determinante para a atividade antifúngica dessas moléculas. Por exemplo, sabe-se que aldeídos alifáticos são muito eficientes para o controle de mofo cinzento em pós-colheita (ARCHIBOLD et al., 1997). A natureza dos compostos exsudados por diferentes isolados bacterianos pode ser determinante para as diferenças de capacidade de controle de *B. cinerea* entre os mesmos.

Os isolados que tiveram capacidade de controle de *Botrytis cinerea* *in vitro* foram selecionados para ensaios posteriores. Primeiramente, selecionou-se apenas isolados que tenham inibido mais do que 65% do crescimento micelial *in vitro* em ambos os testes. Além disso, alguns isolados pertenciam à gêneros de patógenos humanos (ANDRADE, 2017) e, portanto, visando a aplicação desses isolados no controle de *B. cinerea* em morango, foram descartados. Finalmente, os isolados 24F, 29F, 65F, 132R, 26F e MQT16M1 foram selecionados para ensaios posteriores.

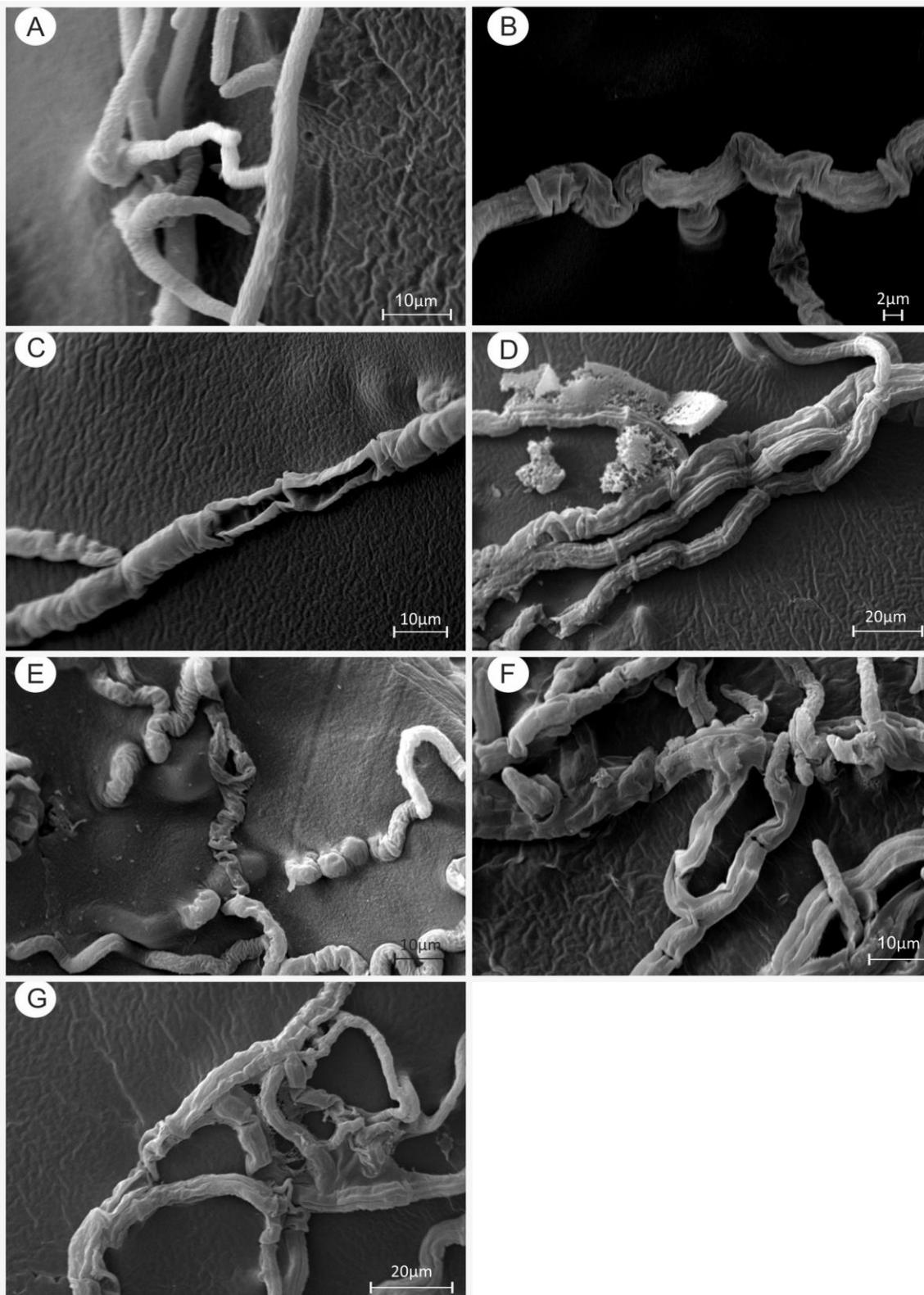
O efeito dos metabólitos antifúngicos exsudados pelas bactérias sobre a morfologia de hifas terminais de *Botrytis cinerea* foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 4 e 5). A partir dessa análise, intensa destruição dos micélios foi observada nos tratamentos com as bactérias selecionadas *in vitro* para o controle do fitopatógeno. Observou-se encolhimento e desintegração das hifas.

Figura 4. Análise em microscopia eletrônica de varredura do efeito dos isolados bacterianos obtidos a partir de folhas e raízes de morangueiro sobre alterações morfológicas em hifas de *Botrytis cinerea* em teste de antagonismo direto.



Legenda: Efeitos dos tratamentos em teste de antagonismo. A: Controle; B: isolado 24; C: isolado 26; D: isolado 29; E: isolado 132; F: isolado MQT16M1 e G: isolado 65.

Figura 5 - Análise em microscopia eletrônica de varredura do efeito dos isolados bacterianos obtidos a partir de folhas e raízes de morangueiro sobre alterações morfológicas em hifas de *Botrytis cinerea* em teste de produção de compostos antifúngicos voláteis.



Legenda: A: controle; B: isolado 24; C: isolado 26; D: isolado 29; E: isolado 132; F: isolado MQT16M1e G: isolado 65.

As imagens obtidas no presente trabalho evidenciam clara ruptura das hifas fúngicas, com aspecto ressecado das mesmas, sendo os mesmos resultados observados em testes de antagonismo e de produção de antifúngicos voláteis. Esses resultados foram visivelmente distinguíveis aos observados no tratamento controle, no qual não foi observado dano visível às hifas (Figuras 4 e 5).

Danos à hifas de fitopatógenos ocasionados por bactérias promotoras de crescimento também foram relatados por Jasim et al (2016) em ensaios com *Rhizoctonia* sp. e *Pythium* sp.. Nesse trabalho, imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciaram destruição da matriz micelial, lise, rompimento e desintegração de hifas, além da supressão da formação de novo micélio.

Em ensaios realizados com *Botrytis cinerea*, análises microscópicas também têm evidenciado modificações na estrutura das hifas, sobretudo com espessamento das hifas, coagulação do citoplasma, formação de vesículas na parede celular e quebra de organelas quando o fitopatógeno encontra-se na presença de bactérias promotoras de crescimento (BARKA et al., 2002). Ainda sobre a mesma espécie fúngica, ensaios de Kilanifeki e Jaoua (2011) demonstraram que filtrado livre de células de bactérias da espécie *Burkholderia cepacia* induziram mudanças morfológicas em hifas, evidenciando que o efeito dessas bactérias pode estar relacionado à exsudação de compostos bioativos.

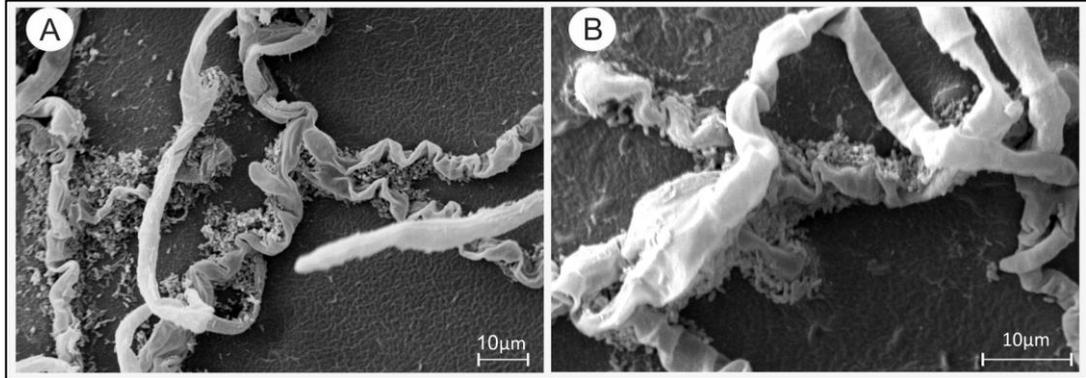
Straus e Hancock (2006) relatam que os danos causados por bactérias sobre hifas fúngicas estão principalmente relacionados à rápida despolarização da membrana ocasionada por metabólitos exsudados pelas bactérias, favorecendo a translocação de moléculas bioativas pela membrana e resultando em perda de componentes intracelulares e rompimento da parede celular.

Especificamente nos testes de antagonismo direto *in vitro*, observou-se crescimento da colônia bacteriana do isolado 29 em direção ao fungo. Imagens de microscopia eletrônica de varredura evidenciam a ação dessas bactérias sobre *B. cinerea* e a colonização das hifas deste fungo (Figura 6).

Além da produção de compostos antifúngicos, bactérias podem realizar parasitismo, pelo qual são capazes de colonizar e inviabilizar estruturas do patógeno (HIRPARA et al., 2017). Esse fenômeno foi observado no presente trabalho.

Resultados observados neste trabalho evidenciam o fato de que alguns microrganismos podem apresentar mais de um mecanismo de controle biológico de fitopatógeno, aumentando ou permitindo a eficiência da interação.

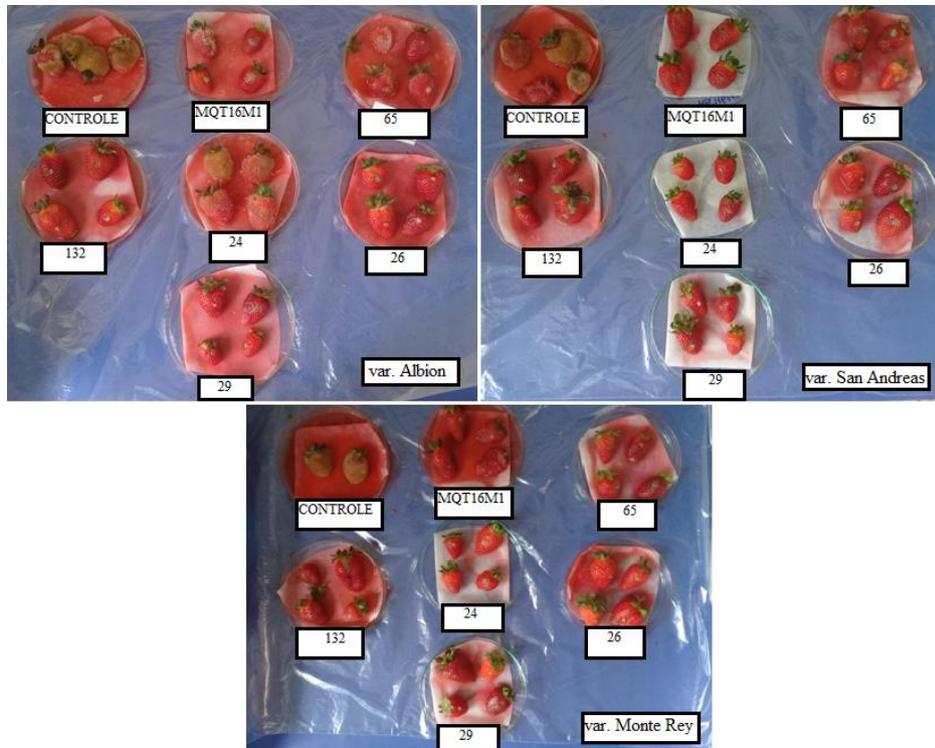
Figura 6 - Análise em microscopia eletrônica de varredura do efeito do isolados bacteriano 29 sobre hifas de *Botrytis cinerea* em teste antagonismo.



Legenda: Detalhe da colonização de hifas de *Botrytis cinerea* por bactérias promotoras de crescimento (A e B são referentes à colonização das hifas pelo isolado 29).

O tratamento de pseudofrutos de morango com os isolados bacterianos selecionados *in vitro* para o controle de *Botrytis cinerea* mostrou-se efetivo em reduzir a severidade de doença durante os primeiros 3 dias de pós-colheita do pseudofruto com a inoculação do fitopatógeno (Figura 7).

Figura 7 – Incidência de *Botrytis cinerea* em morangos após 3 dias de tratamento



Legenda: Nomes abaixo de cada placa contendo pseudofrutos são referentes aos tratamentos. De cima para baixo, a partir da esquerda: controle (sem inoculação), inoculação do isolado MQT16M1, inoculação do isolado 65, inoculação do isolado 132, inoculação do isolado 24, inoculação do isolado 26 e inoculação do isolado 29. À direita inferior de cada imagem, variedades em que os isolados foram testados. De cima para baixo, a partir da esquerda: var. Albion, var. San Andreas e var. Monte Rey.

Para pseudofrutos da variedade Albion, um potencial de controle de até 70,84% do desenvolvimento da doença foi observado com a aplicação de bactérias para o controle biológico nos pseudofrutos. O tratamento de pseudofrutos das cultivares San Andreas e Monte Rey, menos susceptíveis à doença, com isolados bacterianos selecionados *in vitro* levou ao controle de mais de 90% do crescimento de *Botrytis cinerea* em pós-colheita (Tabela 1). O isolado 29 apresentou-se como o mais efetivo para o controle do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em morango em pós-colheita para a cultivar Albion, mais susceptível. Outros isolados apresentaram valores intermediários de controle do mofo cinzento, à exceção do isolado 24 que não foi significativamente diferente do controle sem inoculação. Para a cultivar San Andreas, o isolado 29 também foi mais eficiente no controle de mofo cinzento em pós-colheita. Para a cultivar Monte Rey, os tratamentos com os isolados 29 e MQT16M1 não foram significativamente diferentes entre si. Outros isolados apresentaram valores intermediários de controle do mofo cinzento.

Tabela 1 – Índice de doença (%) em pseudofrutos de morango das cultivares Albion, San Andreas e Monte Rey inoculados com bactérias endofíticas de morango selecionadas *in vitro* para a promoção indireta de crescimento.

| Tratamento | Cultivares | | |
|------------|------------|-------------|-----------|
| | Albion | San Andreas | Monte Rey |
| Controle | 93,75 b | 95,83 b | 87,50 b |
| 24 | 89,58 b | 10,41 ab | 10,42 ab |
| 26 | 64,58 ab | 14,58 ab | 10,42 ab |
| 29 | 29,16 a | 6,25 a | 8,33 a |
| 65 | 58,33 ab | 22,91 ab | 16,67 ab |
| 132 | 68,75 ab | 22,91 ab | 12,5 ab |
| MQT16M1 | 50,00 ab | 14,58 ab | 6,25 a |

Legenda: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Dunn a 5% de probabilidade.

Ensaio *in vivo* evidenciam o controle de mofo cinzento por bactérias promotoras de crescimento vegetal. Em plantas de videira, Andreolli et al (2019) observaram redução de até 88% da intensidade da doença. Donmez et al (2011) observaram diminuição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* e da germinação de conídios da mesma espécie em pseudofrutos de morango após inoculação de bactérias do gênero *Bacillus*.

Em experimentos *in vivo* com pepino e morango, Kim et al (2013) observaram que diferentes isolados bacterianos expressaram diferentes potenciais de controle de *Botrytis cinerea*, chegando à 62,5 e 84% para pepino e morango, respectivamente. Nesse mesmo

trabalho, o controle de mofo cinzento observado em tratamentos com inoculação de bactérias foi equiparado ao controle da doença no tratamento com aplicação de fungicida.

Outros trabalhos evidenciam que a exposição de plantas de morangueiro à compostos voláteis de bactérias da espécie *Bacillus methylotrophicus* ocasionou atraso na infecção de plantas por *Botrytis cinerea*, bem como a diminuição do tamanho de lesões ocasionadas pelo fungo em pecíolos e diminuição do número de pecíolos necrosados em plantas (VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018).

Gao et al (2018) relatam que o controle de *Botrytis cinerea* em folhas e frutos está principalmente relacionado à danos à integridade da membrana plasmática do fitopatógeno. Além da alteração da permeabilidade e integridade da membrana plasmática, Zhao et al (2018) descrevem o controle de *B. cinerea* por outros microrganismos como resultante da fragmentação do DNA, desintegração da estrutura celular, despolarização da membrana mitocondrial e aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio nas células.

Entretanto, além da produção de compostos antifúngicos, bactérias promotoras de crescimento podem controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos *in vivo* por outros mecanismos, os quais envolvem competição por espaço e nutrientes (HAIDAR et al., 2016), produção de β -1,3-glucanase, quitinase, celulase, pectinase e outras enzimas líticas (QUECINE et al., 2012; GEORGE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016), ácido cianídrico (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; RODRIGUES et al., 2016), sideróforos (FELESTRINO et al., 2017).

Ensaio futuros visando o controle biológico de mofo cinzento em pseudofrutos pela inoculação de bactérias promotoras de crescimento em mudas e na fase de floração devem ser realizados. Nesse caso, é possível que, além dos mecanismos citados, bactérias sejam capazes de induzir a defesa vegetal, como já relatado em outros ensaios (QUECINE et al., 2012; DU et al., 2016; VICENTE-HERNÁNDEZ et al., 2018; ELIAS et al., 2018). Du et al (2016), observaram mudanças no proteoma de plantas de pepino após a inoculação com *Paenibacillus polymyxa*, sendo as mesmas relacionadas à síntese de proteínas relacionadas à tolerância à estresse oxidativo, estímulo ao metabolismo energético (provavelmente para estímulo do crescimento vegetal e resistência ao patógeno) e estímulo à síntese de jasmonato, normalmente relacionado à resposta de defesa das plantas quando interagem com fitopatógenos. Quecine et al (2012), observaram a síntese de enzimas quitinases e endoglucanases por tecidos radiculares de plantas após a inoculação com bactérias promotoras de crescimento. Experimentos de evolução experimental de bactérias que desenvolvem interações harmônicas com plantas têm demonstrado que muitas, ainda que apresentem genes

relacionados à promoção de crescimento, ainda incitam reações de defesa da planta. Esses mesmos experimentos têm demonstrado que ao longo da evolução desses microrganismos, a indução de respostas de defesa das plantas no momento da infecção torna-se apenas mais branda e regulada, não sendo perdida (MARCHETTI et al., 2010; MARCHETTI et al., 2014).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que isolados de bactérias promotoras de crescimento em plantas, obtidos a partir de folha e raiz de morangueiro apresentam diferentes potenciais de controle de *Botrytis cinerea*, destacando-se os isolados 24, 26, 65, 132, MQT16M1, sobretudo, o isolado 29, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.

ANDRADE, F.M. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento e inoculação em morangueiro**. 2017. 72p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

ANDRADE, F.M.; PEREIRA, T.A.; SOUZA, T.P.; GUIMARÃES, P.H.S.; MARTINS, A.D.; SCHWAN, R.F.; PASQUAL, M.; DÓRIA, J. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223-225, p. 120-128, 2019.

ANDREOLLI, M.; LAMPIS, S.; ZAPPAROLI, G. ; ANGELINI, E.; VALLINI, G. Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research**, v.183, p.42-52, 2015.

ANDREOLLI, M.; ZAPPAROLI, G.; ANGELINI, E.; LUCCHETTA, G. ; LAMPIS, S. ; VALLINI, G. *Pseudomonas protegens* MP12: a plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. **Microbiological Research**, v.219, p.123-131, 2019.

ARCHIBOLD, D.D.; HAMILTON-KEMP, T.R.; BARTH, M.M.; LANGLOIS, B.E. Identifying natural volatile compounds that control gray mold (*Botrytis cinerea*) during postharvest storage of strawberry, blackberry and grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.4032-4037, 1997.

AVENOT, H.F.; QUATTRINI, J.; PUCKETT, R. ; MICHAILIDES, T.J. Different levels of resistance to cyprodinil and iprodione and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates collected from pistachio, grape and pomegranate fields in California. **Crop Protection**, v.112, p.274-281, 2018.

AWLA, H.K.; KADIR, J.; OTHMAN, R.; RASHID, T.S.; WONG, M.Y. Bioactive compounds produced by *Streptomyces* sp. isolate UPMRS4 and antifungal activity against *Pyricularia oryzae*. **American Journal of Plant Sciences**, v.7, p.1077-1085, 2016.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plant and other organisms. **Annual Review in Plant Biology**, v.57, p.233-266, 2006.

BARKA, E.; GOGNIES, S.; NOWAK, J.; AUDRAN, J.C.; BELARB, A. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. **Biological Control**, v.24, p.135-142, 2002.

BOLÍVAR-ANILLO, H.J.; GARRIDO, C.; COLLADO, I.G. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-20, 2019.

BOZZOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy**: principles and techniques for biologists. Boston: Jones and Bartlett, 1999, 670p.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.; GILARD, F.; BRULÉ, L.; QUILLERÉ, I.; GOURION, B.; RATET, P.; SOUZA, E.M.; LEA, P.J.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v.12, n.3, 2017.

CAMILI, E.C.; BENATO, E.A.; PASCHOLATI, S.F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva Italia contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.215-221, 2007.

CANG, T.; SUN, C.; ZHAO, H.; TANG, T.; ZHANG, C.; YU, R.; WANG, X.; WANG, Q.; DAI, F.; ZHAO, X. Residue behavior and risk assessment of imidacloprid applied on greenhouse – cultivated strawberries under different application conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, p.5024-5032, 2018.

COELHO-JUNIOR, J.M.; Strawberry cultivars: knowing to expand and reduce the environmental impacts. **Revista Geama**, v.5, n.1, p.138-147, 2016.

COELHO JUNIOR, J.M. Strawberry farming with lichens: an alternative to the environment. **Revista Geama**, v.5, n.1, p.123-137, 2016.

DEAN, R.; VAN KAN, J.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v.13, n.1-17, 2012.

DONMEZ, M.F.; ESITKEN, A.; YILDIZ, H.; ERCISLI, S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v.21, n.4, p.758-763, 2011.

DU, N. ; SHI,L. ; YUAN,Y. ; LI,B. ; SHU,S. ; SUN,J. ; GUO,S. Proteomic analysis reveals the positive roles of the plant-growth-promotng-rhizobacterium NSY50 in the response of cucumber roots to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* inoculation. **Frontiers in Plant Science**, v.7, 2016.

DUTTA, D.; PUZARI, K.; GOGOI, R.; DUTTA, P. Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, p.621-629, 2014.

ELAD, Y.; STEWART, A. Microbial control of *Botrytis* spp. In: ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. **Botrytis**: biology, pathology and control. Nova York: Springer, 2007, 392p.

ELIAS, J.M.; GUERRERO-MOLINA, M.F.; MARTÍNEZ-ZAMORA, M.G.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Plant Biology**, v.20, n.3, 2018.

ESTEVE-TURRILAS, F.A.; MERCADER, J.V.; AGULLÓ, C.; ABAD-SOMOVILLA, A.; ABAD-FUENTES, A. Highly sensitive monoclonal antibody-based immunoassays for boscalid analysis in strawberries. **Food Chemistry**, 2017.

ESMAEEL, Q.; JACQUARD, C.; CLÉMENT, C.; SANCHEZ, L.; BARKA, E.A. Genome sequencing and traits analysis of *Burkholderia* strains reveal a promising biocontrol effect against grey mould disease in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p.35-40, 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. **Production quantities by country: Average 2016 – 2017**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em 21 jan. 2019

FELESTRINO, E.B.; SANTIAGO, I.F.; FREITAS, L.S.; ROSA, L.H.; RIBEIRO, S.P.; MOREIRA, L.M. Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaea* – rhizosphere-host biological interface: a neglected model of bacterial protection. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 2017.

FERNANDO, W.G.D.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 955-964, 2005.

FERREIRA-SAAB, M.; FORMEY, D.; TORRES, M.; ARAGÓN, W.; PADILLA, E.A.; TROMAS, A.; SOHLENKAMP, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SERRANO, M. Compounds released by the biocontrol yeast *Hanseniaspora opuntiae* protect plants against *Corynespora cassiicola* and *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

FUJIMOTO, A. **Identificação de compostos orgânicos voláteis e antibióticos produzidos por *Bacillus* spp. envolvidos no controle da mancha preta dos citros**. 2017. 74p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2017.

GAO, P.; QIN, J.; LI, D.; ZHOU, S. Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. **Plos One**, v.13, n.1, 2018.

GEORGE, P.; GUPTA, A.; GOPAL, M.; THOMAS, L.; THOMAS, G.V. Multifarious beneficial traits and plant growth promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF267 isolated from rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.109-117, 2013.

GEORGE, E.; KUMAR, S.N.; JACOB, J.; BOMMASANI, B.; LANKALAPALLI, R.S.; MORANG, P.; KUMAR, B.S.D. Characterization of the bioactive metabolites from a plant growth-promoting rhizobacteria and their exploitation as antimicrobial and plant growth-promoting agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.176, p.529-546, 2015.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia** : processo ecológico em agricultura sustentável. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS, 2000. 653p.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTIAS, C.; ROTHERAY, E.L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides and lack of flowers. **Science**, v.347, n.6229, 2015.

GRABKE, A.; FERNÁNDEZ-ORTUNO, D.; AMIRI, A.; LI, X.; PERES, N.A.; SMITH, P.; SCHNABEL, G. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. **Phytopathology**, v.104, p.396-402, 2014.

HARDOIM, P.; OVERBEEK, L.; BERG, G.; PIRTTILA, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DORING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbial Molecular Biology Reviews**, v.79, p. 293-320, 2015.

H Aidar, R.; FERMAUD, M.; CALVO-GARRIDO, C.; ROUDET, J.; DESCHAMPS, A. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. **Phytopathologia Mediterranea**, v.55, p.13-34, 2016.

HIRPARA, D.G.; GAJERA, H.P.; HIRAPARA, J.G.; GOLAKIYA, B.A. Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Infection, Genetics and Evolution**, n.55, 2017.

ILHAN,K.; AKGUN,O.; KARABULUT,A. Efficacy and population monitoring of bacterial antagonists for gray mold (*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.) infecting strawberries. **Biocontrol**, v.58, n.4, p.457-470, 2013.

JANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, v.2. Ed. Ceres, 1997, 686p.

JASIM,B. ; BENNY,R. ; SABU,R. ; MATHEW,J.; RADHAKRISHNAN,E.K. Metabolite and mechanistic basis of antifungal property exhibited by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* BmB1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.179, p.830-845, 2016.

JIANG, C.H.; LIAO, M.J.; WANG, H.K.; ZHENG, M.Z.; XU, J.J.; GUO, J.H. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v.126, p.147-157, 2018.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X.H.; HENNE, A.; LIESEGANG, H. ; HITZEROTH, G. ; FRANKE, P.; JOACHIM, V.; BORRISS, R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.4, 2004.

KILANIFEKI, F.O.;JAOUA, S. Biological control of *Botrytis cinerea* using an antagonistic and endophytic *Burkholderia cepacia* (Cs5) for the vine plantlets protection. **Canadian Journal of Microbiology**, v.57, p.896-901, 2011.

KIM, Y.S.; SONG, J.G.; LEE, I.K.; YOO, W.H.; YUN, B.S. *Bacillus* sp. BS061 suppresses powdery mildew and gray mold. **Mycobiology**, v.41, n.2, p.108-111, 2013.

LEROCH, M.; KRETSCHMER, M.; HAHN, M. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.63-65, 2011.

LEROCH, M.; PLESKEN, C.; WEBER, R.W.S.; KAUFF, F.; SCALLIET, G.; HAHN, M. Gray mold populations in German strawberry fields show multiple fungicide resistance and are dominated by a novel clade close to *Botrytis cinerea*. **Applied Environmental Microbiology**, v.79, p.159-167, 2013.

LOPES, U.P.; ZAMBOLIM, L.; CAPOBIANGO, N.P.; GRACIA, N.A.O.; FREITAS-LOPES, R.L. Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides controlling gray mold on strawberry in Brazil. **Bragantia**, v.76, n.2, p.266-272, 2017.

MAAS, J.L. Compendium of strawberry diseases. Saint Paul: APS Press, 1998, 128p.

MARCHETTI, M.; CAPELA, D.; GLEW, M.; CRUVEILLER, S.; CHANE-WOON-MING, B.; GRIS, C.; TIMMERS, T.; POINSOT, V.; GILBERT, L.B.; HEEB, P.; MÉDIGUE, C.; BATUT, J.; MASSON-BOIVIN, C. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. **Plos Biology**, v.8, n.1, 2010.

MARCHETTI, M.; JAUNEAU, A.; CAPELA, D.; REMIGI, P.; GRIS, C.; BATUT, J.; MASSON-BOIVIN, C. Shaping bacterial symbiosis with legumes by experimental evolution. **MPMI**, v. 27, n.9, p.956-964, 2014.

MORAIS, M.C.; MUCHA, A.; FERREIRA, H.; GONÇALVES, B.; BACELAR, E.; MARQUES, G. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2019.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, 2ed. Lavras: Editora UFLA, 2006, 729p.

NIELSEN, T.H.; SORENSEN, D.; TOBIASEN, C.; ANDERSEN, J.B.; CHRISTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M.; SORENSEN, J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3416-3423, 2002.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2011.

NUNES, C.A. Biological control of postharvest diseases of fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, p.181-196, 2012.

PERSHINA, E.; VALKONEN, J.; KURKI, P.; IVANOVA, E.; CHIRAK, E.; KORVIGO, I.; PROVOROV, N.; ANDRONOV, E. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. **Plos One**, v.10, n.12, 2015.

QUECINE, M.C.; ARAUJO, W.L.; ROSSETTO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane growth

promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.21, p.7511-7518, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

RODRIGUES, A.A.; FORZANI, M.V.; SOARES, R.S.; SIBOV, S.T.; VIEIRA, J.D.G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.2, p.149-158, 2016.

SHTERNISH, M.V.; BELYAEV, A.A.; SHPATOVA, T.V.; LELYA, A.A. Influence of *Bacillus* spp. on strawberry gray-mold causing agent and host plant resistance to disease. **Contemporary Problems of Ecology**, v.8, n.3, p.393-396, 2015.

STRAUS, S.K.; HANCOCK, R.E.W. Mode of action of the new antibiotic for gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.175, n.9, p.1215-1223, 2006.

STUART, A.K.C.; STUART, R.M.; PIMENTEL, I.C. Effect of agrochemicals on endophytic fungi community associated with crops of organic and conventional soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Agriculture and Natural Resources**, v.52, p.388-392, 2018.

SYSTAT SOFTWARE Inc. **SigmaPlot for Windows, version 13**. 2006. Disponível em: <http://www.systat.com/products/sigmaplot/>.

TORAL, L.; RODRÍGUEZ, M.;BÉJAR, V.; SAMPEDRO, I. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

TODESCHINI, V.; AITLAHMIDI, N.; MAZZUCCO, E.; MARSANO, F. ; GOSETTI, F. ; ROBOTTI, E. ; BONA, E.; MASSA, N.; BONNEAU, L.; MARENCO, E.; WIPF, D.; BERTA, G.; LINGUA, G. Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality and volatilome. **Frontiers in Plant Science**, v.9, p.1-22, 2018.

VALÉ, M.; NGUYEN, C.; DAMBRINE, E.; DUPOUEY, J.L. Microbial activity in the rizosphere soil of six hrbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.2329-2333, 2005.

VESPERMANN, A.; KAI, M.; PIECHULLA, B. Rhizobial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.17, p.5639-5641, 2007.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

VICENTE-HERNÁNDEZ, A.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; VALENCIA-CANTERO, E.; RAMÍREZ-ORDORICA, A.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; GARCIA-JUÁREZ, P.; MARCÍAS-RODRÍGUEZ, L. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulates the growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* ‘Aromas’) plants in vitro and slows *Botrytis cinerea*

infection by two different methods of interaction. **Journal of Plant Growth Regulation**, 2018.

WANG, H. ; YAN, Y. ; WANG, J. ; ZHANG, H. ; QI, W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. **Plos One**, v.7, n.1, 2012.

YUAN, J. ; RAZA, W. ; SHEN, Q. ; HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.16, p.5942-5944, 2012.

ZHANG, T. ; SHI, Z.Q. ; HU, L.B. ; CHENG, L.G. ; WANG, F. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.783-788, 2008.

ZHAO, P.; REN, A.; DONG, P.; SHENG, Y.; CHANG, X.; ZHANG, X. The antimicrobial peptaibol thichokonin IV promotes plant growth and induces systemic resistance against *Botrytis cinerea* infection in moth orchid. **Journal of Phytopathology**, 2017.

ZHAO, P.; REN, A.; DONG, P.; SHENG, Y.; LI, D. Antimicrobial peptaibols, trichokonins, inhibit mycelia growth and sporulation and induce cell apoptosis in the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.54, n,4, p. 396-403, 2018.