



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES
CLAROS**

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA
“PRATA-ANÃ”: FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO,
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO E
PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO**

LEANDRO FERNANDES ANDRADE

2012

LEANDRO FERNANDES ANDRADE

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA “PRATA-ANÃ”:
FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO, SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE
CÁLCIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Science*”.

Orientadora
Prof.^a DSc. Silvia Nietsche

JANAÚBA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

A553b

Andrade, Leandro Fernandes.

Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-Anã”: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético [manuscrito] / Leandro Fernandes Andrade. – 2012.

67 p.

Dissertação (mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros-Janaúba, 2012.

Orientadora: Profª D. Sc. Silvia Niestche.

1. Ácido indol-3-acético. 2. Bactérias endofíticas. 3. Fosfato de cálcio tribásico. 4. *Musa* spp. I. Niestche, Silvia. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 634.772

LEANDRO FERNANDES ANDRADE

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA “PRATA-ANÃ”:
FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO, SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE
CÁLCIO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de “*Magister Science*”.

APROVADA em 31 de agosto de 2012.

Prof^ª. D.Sc. Silvia Nietsche
UNIMONTES (Orientadora)

Prof^ª. D.Sc. Adélica Aparecida Xavier
UNIMONTES (Coorientadora)

Pesq. D.Sc. Luciana Nogueira Londe
EPAMIG/URENM

Prof^ª. D.Sc. Márcia Regina Costa
UNIMONTES

**JANAÚBA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

*A Deus, fonte inesgotável de sabedoria
e amor.*

*À minha família, em especial à minha
amada mãe, Aurelinda, por todo o
amor, apoio e ensinamentos.*

Dedico

A vida me ensinou a nunca desistir:

Nem ganhar...

Nem perder...

Mas procurar evoluir...

Alexandre Magno/Thiago Castanho

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela dádiva da vida, pela força a cada dia renovada e pela luz que iluminou meus caminhos até aqui.

À Universidade Estadual de Montes Claros, por ser a via promotora de minha formação acadêmica e ambiente onde encontrei excelentes profissionais que compartilharam seus conhecimentos e experiências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro à execução do projeto de pesquisa.

À minha família que, gentilmente, apoiou-me e não mediu esforços para ajudar-me sempre que precisei. À minha mãe, fonte de carinho e amor, a quem devo minha formação e caráter. Aos meus irmãos, que estiveram sempre ao meu lado e que me deram todo e qualquer apoio de que precisei durante a minha caminhada, minha eterna gratidão.

À Professora Silvia Nietzsche, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela orientação, dedicação e confiança, pelo incentivo e apoio durante a condução dos experimentos e redação da dissertação.

À professora Adelica Xavier, por todo o apoio e paciência durante a condução dos experimentos, pela amizade, e confiança em meio a tantas dificuldades durante o mestrado.

À Professora Márcia Regina, minha sincera gratidão, pela amizade, carinho, apoio e confiança durante todo esse tempo de convívio acadêmico.

À pesquisadora Luciana Londe, pelo apoio, colaboração e participação na banca.

Ao Laboratório de Fitopatologia e seus estagiários, onde fui bem recebido e fui considerado como dessa família durante toda a condução do experimento;

Ao Laboratório de Análises de Solo e Tecidos Vegetais, em especial à Bruna Madureira, que se dispôs a ajudar-me mesmo estando extremamente ocupada;

Ao Laboratório de Processamento de Alimentos (TPAV), em especial, a Irani Santos, pela disponibilidade e preocupação mútua quanto ao andamento das análises;

Ao Laboratório de Métodos Analíticos, ao Professor Dario Oliveira, juntamente à sua bolsista de iniciação científica, Marcela Aguiar, pela disponibilidade e apoio nas análises cromatográficas.

Aos demais laboratórios da Universidade Estadual de Montes Claros, dos quais fiz uso durante a execução de meus experimentos, onde fui muito bem recebido pelos professores responsáveis e pelos seus estagiários.

Agradeço a Suzane Souza, grande amiga, que deixou nossas “filhas” (as bactérias) de herança pra eu tomar conta. Por estar sempre presente, mesmo estando fisicamente longe, ajudando-me com energias positivas, metodologias e sanando dúvidas.

Um agradecimento especial a duas pessoas que deram total apoio à execução para que este trabalho se tornasse possível: Acleide e Gleika, muito obrigado pela força e amizade.

Aos colegas de laboratório, Dona Ana, Samira, Tiago, Emilly, João Alison, Mara e aos mais novos, Débora, Ciene, Adílio, Edson e Elizete; pela ajuda nos experimentos, amizade e convívio durante todo esse tempo. A Josy, meu agradecimento, pela imprescindível ajuda e companheirismo durante toda essa luta.

Aos colegas de mestrado, pela amizade, companheirismo e convívio, proporcionando momento de descontração e desabafos. Agradecimento especial aos colegas e grandes amigos, Cristiane, Néia, Bruninha, Heliselle, Suzane e Thallyta, por acompanharem de perto cada momento de tensão e alegria durante os intermináveis experimentos, como costumávamos falar.

Ao grande amigo Elson Fernandes, pela amizade, apoio e pela lição de vida durante esse tempo de convívio.

Agradeço, ainda, à ajuda distante, porém imprescindível do Prof. D.Sc. Thiago Venâncio (UFSCar), D.Sc. Guilherme Titato (USP) e do D.Sc. Fabrício Cássan (Universidad Nacional de Río Cuarto), auxiliando nas tomadas de decisões quanto às análises cromatográficas, que foi um grande desafio para a equipe.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade...

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Características gerais sobre a cultura da bananeira	4
2.2 Microrganismos endofíticos	7
2.2.1 O nitrogênio e fixação biológica por bactérias endofíticas	9
2.2.2 O fósforo e a solubilização de fosfato insolúvel por bactérias endofíticas	12
2.2.3 Produção de fitormônios por bactérias endofíticas	14
3 METODOLOGIA	17
3.1 Bactérias endofíticas.....	17
3.1.1 Obtenção de bactérias endofíticas	17
3.1.2 Preparo de suspensões bacterianas	20
3.2 Fixação de nitrogênio <i>in vitro</i>	20
3.3 Solubilização de fósforo	22
3.4 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	23
4 RESULTADOS	25
4.1 Fixação de nitrogênio <i>in vitro</i>	25
4.2 Solubilização de fosfato de cálcio	28
4.3 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	35
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Isolados de bactérias endofíticas associadas à bananeira “Prata-Anã” utilizadas nos ensaios de fixação de nitrogênio (FBN), solubilização de fósforo insolúvel (SFI) e produção de ácido indol-3-acético (AIA).....	18
TABELA 2. Detecção da formação de película aerotóxica por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”.	27
TABELA 3. Solubilização de fosfato de cálcio tribásico $[Ca_3(PO_4)_2]$ em meio LGI_m por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira.....	30
TABELA 4. Valores médios dos índices de solubilização (IS) em meio LGI_m suplementado com fosfato de cálcio tribásico $[Ca_3(PO_4)_2]$ por bactérias endofíticas isoladas de bananeira “Prata-Anã” e suas classificações pela escala de eficiência.	34
TABELA 5. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”, em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano (Trp) e sem suplementação.....	37

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Película aerotáxica (seta) típica produzida por microrganismos diazotróficos em meio livre de nitrogênio (NFb). 26
- FIGURA 2.** Alteração na coloração verde para azul do meio livre de nitrogênio (NFb) em isolados de bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”..... 26
- FIGURA 3.** Halo de solubilização formado em meio LGI_m suplementado com fosfato de cálcio tribásico [Ca₃(PO₄)₂], pela bactéria endofítica EB-126, isolada de raízes de bananeira “Prata-Anã”. 29
- FIGURA 4.** Valores médios de diâmetro de colônia (Ø de colônia) e de halo de solubilização de fosfato (Ø de halo), em mm, em meio LGI_m suplementado com fosfato de cálcio tribásico [Ca₃(PO₄)₂] por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”. Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas distintas diferem entre si em diâmetro de halo e de colônia, respectivamente, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade (P<0,05)..... 32
- FIGURA 5.** Alteração do meio de cultura na presença de bactérias endofíticas produtoras de ácido indol-3-acético (AIA) (Coloração rósea positiva para produção de AIA). 35
- FIGURA 6.** Valores médios de concentração de ácido indol-3-acético (µg.ml⁻¹) em meio TSA 10%, com e sem suplementação de L-triptofano, por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”. Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade (P<0,05). 39

RESUMO

ANDRADE, Leandro Fernandes. **Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-Anã”: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético.** 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido)-Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

As bactérias endofíticas têm mostrado grande potencial para uso biotecnológico, com destaque no incremento da produtividade de espécies vegetais por meio da fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e produção de reguladores de crescimento. A associação dessas bactérias com as plantas podem reduzir a necessidade do uso de insumos agrícolas nitrogenados, bem como potencializar o uso de insumos fosfatados, promovendo, ainda, maior desempenho das plantas devido à síntese de fitormônios. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a fixação biológica de nitrogênio, a capacidade de solubilização de fosfato e a produção de ácido indol-3-acético (AIA) por bactérias endofíticas associadas a raízes de bananeira “Prata-Anã”. Para determinar a fixação biológica de nitrogênio, foram selecionados 24 isolados que apresentaram o gene *nifH*, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Utilizou-se o crescimento dos isolados selecionados em meio livre de nitrogênio NFb, quando avaliou-se a presença de película aerotóxica típica. Os resultados foram submetidos a estudos de distribuição de frequência. Meio suplementado com fosfato de cálcio tribásico foi utilizado para determinar o potencial de solubilização de 40 isolados de bactérias endofíticas, sendo a eficiência de solubilização determinada pela razão entre o diâmetro do halo de solubilização e o diâmetro da colônia bacteriana. A produção de AIA foi detectada pelo crescimento bacteriano em meio líquido TSA 10% suplementado com L-triptofano. As bactérias que sintetizaram AIA em meio TSA 10% com L-triptofano foram selecionadas para ensaio de produção de AIA em meio TSA 10% sem suplementação de L-triptofano. A presença de AIA foi determinada pela reação do meio TSA 10% com reagente ácido-fêrrico e sua concentração foi determinada em espectrofotometria pela absorbância a 530 nm de comprimento de onda. Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizados com 40 tratamentos e três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e, quando apresentaram diferença significativa pelo teste F, foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹**Comitê de Orientação:** Prof^a. Dr^a. Silvia Nietsche – UNIMONTES (Orientadora); Prof^a. Dr^a. Adélica Aparecida Xavier (Coorientador); Márcia Regina Costa-UNIMONTES; Luciana Nogueira Londe - EPAMIG

Dentre os isolados selecionados para ensaio de fixação biológica de nitrogênio, 83% apresentaram a película aerotóxica em meio livre de N, sendo que 67% destes isolados são do gênero *Bacillus*. Dentre os 40 isolados avaliados para o potencial de solubilização de fosfato, 37,5% apresentaram halo de solubilização. O isolado EB-53 (*Lysinibacillus* sp.) apresentou alta solubilização, enquanto 73% dos isolados solubilizadores apresentaram baixa solubilização. A síntese de AIA foi detectada entre os isolados, quando 40% deles apresentaram a capacidade de sintetizar AIA na presença de L-triptofano e destes, 17,5% sintetizaram-no na ausência de L-triptofano. O isolado EB-40 (*Bacillus* sp.) apresentou o maior teor de AIA ($47,88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) em meio suplementado com L-triptofano, apresentando, também, capacidade de sintetizar AIA na ausência de L-triptofano. Os isolados EB-126 (*Bacillus subtilis*) e EB-47 (*Bacillus* sp.) apresentaram capacidade simultânea para fixação de N, solubilização de fosfato e produção de AIA *in vitro*.

Palavras-Chave: *Musa spp.*, ácido indol-3-acético, fosfato de cálcio tribásico, diazotrófica, *Bacillus* sp.

ABSTRACT

ANDRADE, Leandro Fernandes. **Endophytic bactéria of “Prata-Anã” banana tree: nitrogen fixation, calcium phosphate solubilization and production of indol-3-acetic acid.** 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido)-Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.²

The endophytic bacteria have been showing great potential for biotechnological use, with prominence in the increment of the productivity of plant species by the nitrogen fixation, phosphorus solubilization and production of growth regulators. The association of those bacteria with the plants can reduce the need the use of nitrogen fertilizers, as well as to potentiate the use of phosphate fertilizers, promoting, also, larger acting of the plants due to the growth regulators' synthesis. Thus, the objective of the present work was to evaluate the nitrogen biological fixation, the capacity of phosphate solubilization and the production of indol-3-acetic acid (IAA) by endophytic bacteria associated to roots of "Prata-Anã" banana tree. To determine the nitrogen biological fixation, 24 isolates that presented *nifH* gene were selected, in entirely randomized design, with three repetitions. The selected isolates' growth was used in medium free from nitrogen NFb, when the presence of pellicle formation was evaluated. The results were submitted to studies of frequency distribution. Medium supplemented with calcium phosphate tribase was used to determine the solubilization potential of 40 isolates of endophytic bacteria, being the solubilization efficiency determined by the ratio between the solubilization halo diameter and the bacterial colony diameter. The production of IAA was detected by the bacterial growth in 10% TSA medium supplemented with L-tryptophan. The bacteria that synthesized IAA in 10% TSA medium with L-tryptophan were selected for essay of production of IAA in 10% TSA medium without supplementation of L-tryptophan. The presence of IAA was determined by the reaction of 10% TSA medium with acid-ferric reagent and its concentration was determined in spectrophotometry by the absorbance to 530 nm of wave length. The essays were carried out in entirely randomized design with 40 treatments and three repetitions. The results were submitted to analysis of variance and, when they presented significant difference by the F test, they were submitted to Scott-Knott

²**Guidance Committee:** Prof. Dr. Silvia Nietzsche – UNIMONTES (Adviser); Prof. Dr. Adelica Aparecida Xavier (Co-adviser); Márcia Regina Costa- UNIMONTES; Luciana Nogueira Londe - EPAMIG

test to 5% of probability. Among the selected isolates for essay of biological nitrogen fixation, 83% presented the pellicle formation in N free medium, from which 67% are of the *Bacillus* genus. Amongst 40 isolates evaluated for the potential of phosphate solubilization, 37.5% showed solubilization halo. The isolate EB-53 (*Lysinibacillus* sp.) presented high solubilization, while 73% of the solubilizing isolates showed low one. The IAA synthesis was detected among the isolates, when 40% of them presented the capacity to synthesize IAA in the presence of L-tryptophan and of those, 17,5% synthesized it in the absence of L-tryptophan. The isolate EB-40 (*Bacillus* sp.) presented the largest IAA content ($47.88 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) in medium supplemented with L-tryptophan, presenting, also, capacity to synthesize IAA in the absence of L-tryptophan. The isolates EB-126 (*Bacillus subtilis*) and EB-47 (*Bacillus* sp.) presented simultaneous capacity for fixation of N, phosphate solubilization and production of IAA *in vitro*.

Keywords: *Musa* spp., indol-3-acetic acid, calcium phosphate tribase, diazotrophic, *Bacillus* sp.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as frutas, a banana, *Musa* spp., destaca-se como a mais consumida no mundo e sua produção concentra-se principalmente em países tropicais. No Brasil, sua produção encontra-se em vários ecossistemas. Possui grande importância nutricional, econômica e social, sendo um empreendimento altamente rentável e que gera postos de trabalho no campo e na cidade, desenvolvendo as regiões envolvidas em sua produção (FIORAVANÇO, 2003).

De acordo com Robinson (1996), em cultivos comerciais, a bananeira apresenta uma limitada capacidade de armazenar nitrogênio. Os sintomas de deficiência se manifestam rapidamente e quantidades significativas de N precisam ser frequentemente aplicadas, mesmo em solos férteis. Depois do N, o fósforo (P) é o mais importante nutriente, uma vez que esse elemento participa da composição de diversas biomoléculas como a trifosfato de adenosina (ATP), cloroplastos e em processos metabólicos como a fotossíntese, fermentação e o metabolismo celular como um todo (RAVEN *et al.*, 2001). Associado ao crescimento das plantas, e embora seja abundante nos solos, esse nutriente se encontra pouco disponível devido à sua adsorção a outros componentes no solo, como o alumínio e ferro, em solos ácidos, e com o cálcio e magnésio em solos mais alcalinos (ARNOU, 1953).

As raízes da bananeira são adventícias e se propagam horizontalmente na região do topo do solo. Essa limitação do sistema radicular, principalmente em condições de solos tropicais, pode prejudicar o desenvolvimento e a produção da espécie, pois afeta significativamente a absorção de nutrientes e água, e diminuem a capacidade de produção de fitormônios pelas rizobactérias e bactérias endofíticas (PRICE, 1995; STOVER e SIMMONDS, 1987).

Diversos estudos têm demonstrado que bactérias e fungos apresentam estreita relação com suas plantas hospedeiras e tem sido muito eficientes na

aquisição de nutrientes, seja pela fixação biológica de nitrogênio (BALDANI e BALDANI, 2005; CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988), pela solubilização de fosfatos insolúveis (BALDOTTO *et al.*, 2010; WHITELAW, 2000), na produção de fitormônios (CASSAN *et al.*, 2009; KUSS *et al.*, 2007), bem como na supressão de patógenos (BALDOTTO *et al.*, 2010; SHIOMI *et al.*, 2008).

O uso de bactérias endofíticas com capacidade para fixação biológica de nitrogênio, principalmente em plantas não leguminosas, tem sido foco de inúmeras pesquisas (ARAUJO *et al.*, 2000; CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988; MARCON, 2002; REITER *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2007), uma vez que é uma alternativa bastante atrativa para reduzir o uso de fertilizantes químicos nitrogenados. A alta demanda e seu constante aumento de preço torna a produção vegetal mais onerosa (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2002), além de causar danos ambientais devido à metabolização e lixiviação desses para o lençol freático.

A fixação de nitrogênio e a promoção do crescimento das plantas via bactérias endofíticas têm demonstrado resultados expressivos na produção em diversas espécies em diferentes condições edafoclimáticas (BALDANI e BALDANI, 2005; BASTIAN *et al.*, 1998; CASSAN *et al.*, 2009; CAVALCANTE *et al.*, 2007; GRAY e SMITH, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O envolvimento de microrganismos na solubilização de fósforo inorgânico vem sendo estudado desde o início do século XX e desde então inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de compreender os mecanismos associados ao processo, bem como na seleção de bactérias que são metabolicamente mais ativas (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010; RODRIGUES e FRAGA, 1999; SOUCHIE *et al.*, 2005; VERMA *et al.*, 2001; WHITELAW, 2000).

As bactérias solubilizadoras de fósforo atuam sobre o fosfato insolúvel por meio de enzimas fosfatases (GYANESHWAR *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2000), principalmente fosfatases ácidas, pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela redução do pH, tornando então o fosfato disponível para as plantas (NAUTIYAL, 1999; VAZQUEZ *et al.*, 2000; VASSILEV e VASSILEVA, 2003).

O processo microbiológico de solubilização vem ser uma alternativa para disponibilizar fósforo aos vegetais, uma vez que é relatada alta diversidade de microrganismos endofíticos responsáveis pela solubilização de fosfatos no solo por diversos mecanismos de ação como a exsudação de ácidos fracos ou fosfatases alcalinas (ZAPATA e AMANN, 1995).

Bactérias promotoras de crescimento podem atuar de maneira direta ou indireta na promoção do crescimento das plantas. Estudos recentes indicam que a produção de fitormônios (auxinas, citocininas, giberelinas e etileno) e a fixação de nitrogênio atuam de maneira direta na promoção do crescimento (ASSUMPCÃO *et al.*, 2009; HALDA-ALIJA, 2003; REIS JUNIOR *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2002); enquanto que a supressão e a prevenção de organismos fitopatogênicos via produção de efeitos antagonistas e síntese de antibióticos são considerados mecanismos de ação indireta do crescimento das plantas (AMORIM e MELO, 2002; AZEVEDO *et al.*, 2000; BAIS *et al.*, 2006; COMPANT *et al.*, 2010).

Assim, objetivou-se, com este trabalho, avaliar capacidade de fixação biológica de nitrogênio, de solubilização de fosfato de cálcio e produção de auxina *in vitro* por bactérias endofíticas isoladas a partir de raízes de bananeira “Prata-Anã”.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais sobre a cultura da bananeira

A bananeira é uma monocotiledônea herbácea, pertencente à família *Musaceae*, sendo a representante de frutos comestíveis (*Musa* spp.) originada do cruzamento entre *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla, ancestrais diploides de bananas e plátanos cultivados. É comumente aceito que esses dois ancestrais originaram nas regiões que se estendem desde o Papua Nova Guiné até o subcontinente indiano, o primeiro na Malásia e o último na Índia (SIMMONDS, 1973).

As espécies que dão frutos comestíveis são híbridas de ocorrência natural entre as várias subespécies de *M. acuminata* e híbridos interespecíficos entre *M. acuminata* e *M. balbisiana* (PLOETZ *et al.*, 2007). Além da origem bi específica (A = *acuminata*, B = *balbisiana*), a classificação desses grupos de banana comestíveis refere-se também em níveis de grupos genômicos distintos, os quais podem ser diploides (AA, BB e AB), triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) (DANTAS e SOARE FILHO, 1995). No Brasil, as cultivares mais difundidos são Prata, Prata-Anã, Maçã e Pacovan, do grupo AAB; Nanica, Nanicão e Grand Naine do grupo AAA, utilizadas principalmente para exportação (OLIVEIRA, 1999).

A banana constitui importante fonte de alimento, podendo ser utilizada verde ou madura, crua ou processada (cozida, frita, assada e industrializada). Possui vitaminas (A, B e C) e minerais (Ca, K e Fe), com baixos teores calóricos (90 a 120 Kcal/100g) e de gordura (0,37 a 0,48 g/100g). Apesar de conter, aproximadamente, 70% de água, o material sólido é formado principalmente de carboidratos (23 a 32 g/100g), proteínas (1,0 a 1,3 g/100g) e gorduras (BORGES *et al.*, 2004).

Para muitos países, além de ser um alimento complementar da população, a banana apresenta grande relevância social e econômica, servindo como fonte de renda para muitas famílias de agricultores, uma vez que chega a gerar 0,7 emprego direto e 2 indiretos por hectare cultivado (MOREIRA e REBELLO, 2008), gerando postos de trabalho no campo e na cidade e contribuindo para o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua produção (FIORAVANÇO, 2003).

No Brasil, a banana se sobressai entre os principais produtos agrícolas e possui lugar de destaque na preferência dos consumidores dentre as fruteiras (BERNARDI *et al.*, 2004). O país é o quarto maior produtor mundial de banana (FAO, 2011) com área plantada de 513,6 mil hectares e colhida de 477,7 mil hectares, resultando em produção de 6,68 milhões de toneladas e produtividade média de 13,99 ton.ha⁻¹(IBGE, 2011). Contudo, esses rendimentos não refletem a realidade dos perímetros irrigados de melhor nível tecnológico, nos quais as cultivares tipo Prata podem alcançar 30 ton.ha⁻¹ e o subgrupo Cavendish em torno de 45 ton.ha⁻¹ (CORDEIRO *et al.*, 2006).

O Norte de Minas Gerais é uma forte região produtora de banana do tipo Prata, principalmente a cultivar Prata-Anã, que ocupou 13.703 hectares na região no ano de 2009 (IBGE, 2009).

A localização da região Norte-mineira é altamente favorável para a comercialização, pois se encontra entre os mercados da região Sudeste e Sul e os mercados da região Nordeste do Brasil, o que facilita o escoamento da produção (ALMEIDA *et al.*, 2000). Outro aspecto a considerar está relacionado às condições climáticas da região, que contribui para suprir as exigências de qualidade dos consumidores. Segundo Borges *et al.* (2000), a temperatura ótima para o desenvolvimento da cultura é de 28 °C, que é a temperatura média encontrada na região. As condições climáticas, associadas ao manejo adequado da irrigação têm proporcionado baixa incidência de doenças e possibilita oferta

regular e de boa qualidade dos frutos (ALMEIDA *et al.*, 2000; MATTHIESEN e BOTEON, 2003).

A bananeira é uma planta de crescimento rápido que requer, para o seu desenvolvimento e produção, quantidades adequadas de nutrientes disponíveis no solo. O potássio (K^+) e o nitrogênio (NO_3^- e/ou NH_4^+) são os nutrientes mais absorvidos e necessários para o crescimento e produção da bananeira, seguidos pelo magnésio (Mg^+) e pelo cálcio (Ca^{2+}). Em sequência e com menor grau de absorção estão os nutrientes enxofre (SO_4^{2-}) e fósforo (PO_4^-) (BORGES, 2004). Os teores de nutrientes nas plantas de bananeira variam entre cultivares, entre as diferentes partes das plantas e nos estádios de desenvolvimento.

Dentre os macronutrientes, o nitrogênio está mais diretamente relacionado com o desenvolvimento vegetativo, produção e qualidade dos frutos, quando aliado ao potássio, variando a quantidade extraída em função da espécie e/ou da cultivar, do metabolismo, do estágio fenológico e da idade das plantas (ROMERO e ZAMORA, 2006). Sua disponibilidade favorece a emissão e o desenvolvimento de perfilhos, além de aumentar a quantidade de matéria seca, influenciando, também, o desenvolvimento radicular, quando associado ao potássio (GOMES, 1988).

A falta deste nutriente reduz o número de folhas, aumenta o número de dias para a emissão de uma folha, os cachos são raquíticos e o número de pencas menor, e leva a uma clorose generalizada das folhas. Isto ocorre, normalmente, em solos com baixo teor de matéria orgânica, ácidos, onde é menor a mineralização da matéria orgânica, bem como em solos com alta lixiviação e naqueles onde existe seca prolongada (BORGES, 2004).

O fósforo favorece o desenvolvimento vegetativo e o sistema radicular. É requerido em pouca quantidade na bananeira, porém, na sua falta, as plantas apresentam crescimento atrofiado e raízes pouco desenvolvidas (BORGES, 2004), resultando ainda em quebra de pecíolo, clorose marginal em folhas mais

velhas, produção de cachos raquíticos, com irregularidade na maturação e frutos pouco saborosos, uma vez que apresenta menor teor de açúcar (SILVA *et al.*, 1999).

2.2 Microrganismos endofíticos

Quando se procura definir os microrganismos endofíticos, observa-se uma vasta gama de definições, que levam a diferentes interpretações. Essa variedade de definições se dá principalmente pelo fato desses microrganismos apresentarem variados mecanismos de ação e, conseqüentemente, um número expressivo de benefícios aos vegetais. Porém, pode-se definir microrganismos endofíticos como aqueles que colonizam os tecidos internos das plantas em pelo menos um período do seu ciclo de vida, sem causar prejuízos ou danos aparentes ao hospedeiro e não havendo produção de estruturas externas emergindo dos tecidos vegetais (AZEVEDO *et al.*, 2000; AZEVEDO e ARAUJO, 2007). Segundo Misaghi e Donndelinger (1990), essa relação endofítica dá-se por meio de processos coevolutivos desses microrganismos, que conseguiram manter uma relação íntima com seu hospedeiro, sem trazer-lhe prejuízos.

Dentre os microrganismos endofíticos existentes, as bactérias recebem lugar de destaque, uma vez que esse é o grupo mais abundante na região rizosférica e que estabelece as mais diferenciadas relações ecológicas com os vegetais. Por haver colonização dos tecidos internos dos vegetais, os microrganismos endofíticos são beneficiados por serem menos influenciados por fatores como temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta que outros microrganismos que habitam as partes externas (LODEWYCKX *et al.*, 2002).

Diversos trabalhos têm mostrado inúmeros efeitos das bactérias endofíticas. A capacidade de estímulo do crescimento das plantas pode ocorrer por mecanismos diretos, na fixação de nitrogênio (CAVALCANTE *et al.*, 2007;

KUSS *et al.*, 2007; LOIRET *et al.*, 2009), solubilização de fósforo insolúvel (BALDOTTO *et al.*, 2010; SHAHAB *et al.*, 2009), produção de fitormônios (CASSAN *et al.*, 2009; FAGAN, *et al.*, 2007; KUSS *et al.*, 2007; REIS JUNIOR *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2007); e indiretamente, induzindo a resistência ou a ação antagônica a fungos e bactérias (BALDOTTO *et al.*, 2010; SHIOMI *et al.*, 2008) e na biorremediação de áreas poluídas (NEWMAN e REYNOLDS, 2005; GERMAINE, *et al.*, 2004). Tais fatores melhoram o desenvolvimento das plantas e auxiliam no incremento de produção (LUZZIVOTO, 2008). Outros efeitos benéficos para crescimento das plantas incluem o ajuste osmótico, regulação de estômatos, modificação morfológica da raiz com consequente aumento de pelos radiculares, o aumento na absorção de minerais e alteração do metabolismo da planta (ANDREOTE, 2007).

Estudos indicam sua ocorrência em diversas culturas, como a cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988), milho (ARAUJO *et al.*, 2000), videira (BELL *et al.*, 1995), algodão (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997), arroz (STOLZFUS *et al.*, 1997), tomate (PILLAY e NOWAK, 1997), citros (MARCON, 2002), batata (REITER *et al.*, 2003), trigo e sorgo (ZINNIEL *et al.*, 2002), bem como na cultura da banana (SOUZA, 2011) dentre outras, demonstrando o potencial do uso de bactérias endofíticas na produção agrícola.

O perfil de espécies que associam à rizosfera ou a uma raiz vegetal pode ser afetado por diversos fatores como os compostos exsudados pela raiz ou a disponibilidade de água e nutrientes. Esses fatores são alterados ao longo do desenvolvimento da planta, o que sugere a ocorrência de uma sucessão de espécies bacterianas colonizando ativamente a rizosfera e interagindo com a planta. Deve-se somar, ainda, a esta complexidade os fatores de interação entre espécies que colonizam a mesma rizosfera em dado momento do desenvolvimento vegetal. Diferentes bactérias atuam na competição por nutrientes, colonização de nichos, além de produzirem compostos antibióticos,

sideróforos e bacteriocinas, que podem atuar de maneira decisiva no competitivo ambiente rizosférico (ANDREOTE, 2007).

2.2.1 O nitrogênio e fixação biológica por bactérias endofíticas

O nitrogênio é um nutriente essencial, sendo fundamental na formação de biomoléculas, presente em células vegetais na forma de aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas, dentre outros compostos (RAVEN *et al.*, 2001). Porém, em regiões tropicais, frequentemente, é um fator limitante na produção agrícola, visto que os solos dessas regiões possuem deficiência de nitrogênio.

A sua assimilação se dá por uma série de etapas que constituem o ciclo do nitrogênio, sendo sua principal forma química assimilável pelas plantas o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+). O nitrato absorvido é assimilado tanto nas raízes quanto nos brotos, dependendo da sua disponibilidade. Na assimilação de nitrato, este é reduzido a nitrito (NO_2^-) pelo citosol por meio da enzima nitrato redutase, quando o nitrito é reduzido a amônio nos plastídeos da raiz ou cloroplastos com auxílio da enzima nitrito redutase (TAIZ e ZEIGER, 2009). Após sua assimilação, o nitrogênio passa a compor as diversas biomoléculas, responsáveis pelas mais diferentes funções no crescimento e desenvolvimento da planta.

Porém, a maior reserva deste nutriente está na forma gasosa (N_2), inerte para animais e vegetais, sendo incorporado ao ecossistema pela ação de bactérias fixadoras de nitrogênio, também chamadas de diazotróficas.

A fixação biológica de nitrogênio por bactérias endofíticas é tida como importante mecanismo de ação, pois o uso de adubos nitrogenados tem acarretado altos custos de produção, além de danos ao meio ambiente pela lixiviação desses insumos aos lençóis freáticos. O nitrogênio é comumente

encontrado na solução do solo na forma de nitrato, que se encontra livre no solo e, conseqüentemente, sendo carregado facilmente para as águas subterrâneas (JADOSKI *et al.*, 2010).

A fixação biológica de nitrogênio ocorre pela presença do complexo enzimático chamado nitrogenase, que essas bactérias possuem. Esse complexo é responsável por transformar o nitrogênio atmosférico em amônio, que é subsequentemente incorporado em aminoácidos e proteínas (NEVES e RUMJANEK, 1998). Tal processo fornece compostos nitrogenados diretamente para as plantas por meio de associações ou quando os microrganismos morrem e os liberam no ambiente, fornecendo o nitrogênio necessário para o desenvolvimento vegetal (LINDERMANN e GLOVER, 2003).

O complexo enzimático nitrogenase é formado por duas unidades proteicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), sendo responsável por transformar o N_2 em NH_3 , com gastos de energia da planta. A nitrogenase é auxiliada pela enzima ferredoxina, transportadora de elétrons originada do fotossistema I da fase fotoquímica da fotossíntese. A Fe-proteína é, frequentemente, reduzida por um doador de elétrons, se ligando com o magnésio-ATP, que recebe elétrons e passa para outra enzima, a molibdênio-ATP, que passa os elétrons para o nitrogênio, transformando-o em NH_3 , que é liberado por difusão para o citosol da célula infectada. Em contato com o extrato aquoso do citoplasma, o NH_3 é transformado em NH_4 , que é incorporado em moléculas que não possuam efeito tóxico, devido à toxicidade desse composto para as células. As enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase convertem NH_4^+ em aminoácidos, findando o processo de fixação biológica de nitrogênio (FAGAN *et al.*, 2007).

Na literatura, diversos trabalhos estudam a associação de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio nas mais diferentes culturas. Cavalcante *et al.* (2006) isolaram de tecidos de cana-de-açúcar bactérias fixadoras de nitrogênio,

dentre elas *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. *Azotobacter* e *Beijeinckia* foram os primeiros gêneros a serem estudados e se intensificaram com o gênero *Azospirillum* (BALDANI e BALDANI, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Teixeira *et al.* (2007) observaram microrganismos endofíticos em plantas de mandioca, com capacidade para fixar nitrogênio atmosférico e produzir AIA *in vitro*. Espécies endofíticas de *Methylobacterium* com capacidade para fixar N₂ têm sido isoladas de citrus, soja e crotalária (ARAÚJO, *et al.*, 2001; SY *et al.*, 2001; SOBRAL, 2003;) de algodão, milho (MCINROY e KLOEPPER, 1995) e de cultivares selvagens e tradicionais de arroz (ELBELTAGY *et al.*, 2000).

Murty e Ladha (1988) verificaram que a inoculação de *Azospirillum* também aumentou o teor de P e o N em plantas de arroz sob condições de hidroponia. Ganguly *et al.* (1999) estudaram o efeito da inoculação com *Azospirillum* na produção de trigo em casa de vegetação e em condições de campo. Os autores observaram aumento no teor de N e P na parte aérea das plantas, e atribuíram o fato a um maior crescimento das raízes, estimulado, provavelmente, pela associação com os microrganismos.

Estudos de determinação da capacidade de estabelecimento endofítico das bactérias diazotróficas também vêm sendo realizados. No estudo desenvolvido por Perin *et al.* (2003) com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho e arroz, foi constatado que as plantas de milho obtiveram melhor desempenho em comparação às plantas de arroz, relacionando o resultado à capacidade de fornecimento de metabólitos, já que os microrganismos diazotróficos dependem do fornecimento de metabólitos pelas plantas para expressarem sua capacidade de fixar biologicamente o N₂ atmosférico e/ou produzir hormônios de crescimento.

2.2.2 O fósforo e a solubilização de fosfato insolúvel por bactérias endofíticas

O fósforo é um nutriente abundante nos solos, tanto na forma orgânica quanto na inorgânica, apresentando, ainda, grandes reservas acumuladas nos solos agrícolas, decorrentes de aplicações regulares de fertilizantes. Esse nutriente é considerado imóvel no solo e, em solos ácidos, forma compostos insolúveis com o alumínio e ferro, bem como com a matéria orgânica, enquanto que em solos alcalinos liga-se firmemente ao cálcio e magnésio, formando fosfatos pouco solúveis.

O pH do solo influencia a disponibilidade de fósforo para as plantas. As plantas absorvem fosfatos nas formas de HPO_4^{2-} ou HPO_4^- , e em solos ácidos, há predominância da forma de H_2PO_4^- em decorrência das reações de equilíbrio do fósforo no solo. Furtini Neto *et al.* (2001) relatam que o pH que favorece maior disponibilidade de fósforo está entre 6,0 e 6,5. Nessa faixa, ocorre o equilíbrio entre as duas formas de fósforo absorvido pelas plantas.

A adsorção do fosfato é influenciada pelos minerais encontrados nos solos, que apresentam agrupamentos superficiais Fe-OH e Al-OH, aos quais poderá ser adsorvido por meio de troca de ligantes (quimiossorção) com o estabelecimento de ligações covalentes. Além disso, a forma estrutural do mineral e sua superfície específica potencializam o efeito da adsorção (MESQUISA FILHO e TORRENT, 1993).

A principal forma de solubilização tida como mecanismo de bactérias solubilizadoras de fósforo é a excreção de ácidos orgânicos por tais organismos, sendo detectados ácidos mono-, di- e tri-carboxílicos. Há, ainda, uma correlação direta entre a redução do pH e o aumento na disponibilidade de fósforo. Esses ácidos orgânicos secretados são de um grupo de ácidos que atuam na quelatação dos cátions (Al, Fe, Ca) e redução do pH dos solos ácidos (STEVENSON e

COLE, 2005). Outros ácidos responsáveis por dissolver o fósforo do solo são os ácidos glucônicos e keto-glucônicos, de baixo peso molecular (GOLDSTEIN, 1995; DEUBEL *et al.*, 2000). O pH da rizosfera é reduzido pela reação de balanço ânion/cátion, na produção de prótons e bicarbonatos, e nas trocas gasosas (O₂/CO₂) (KHAN *et al.*, 2009).

Em bactérias que não produzem tais ácidos orgânicos, foram observados, ainda, os mecanismos de extrusão de prótons originados da assimilação de NH₄ e da produção de H₂CO₃ da respiração (BAGYARAJ *et al.*, 2000). Acredita-se que a assimilação de glicose por esses microrganismos resulte em produção de ácido glucônico nos espaços periplásmicos (LIU *et al.*, 1992), e tal produção leva à liberação de prótons que, por sua vez, solubiliza o fosfato insolúvel.

Outro mecanismo é a mineralização do fósforo inorgânico pela ação de enzimas do tipo fosfatases, fitases, fosfolipases e nucleotidases, responsáveis pela hidrólise de ésteres fosfatados, resultando em liberação de HPO₄⁻ para a solução do solo (CARMO, 2010). Gyaneshwar *et al.* (2002) relatam que a produção de fosfatase é influenciada pelos teores de fósforo no solo, sendo que a escassez de fósforo é estimulante para sua produção.

Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfato inorgânico. Entre os gêneros com esta capacidade estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Erwinia* (RODRIGUES e FRAGA, 1999) e *Enterobacter* (WHITELAW, 2000).

Gerretsen (1948) demonstra que algumas bactérias da rizosfera são capazes de aumentar a solubilização do fosfato de rocha, resultando em melhor desenvolvimento das plantas.

Yadav e Singh (1990) utilizaram a bactéria *Bacillus megatherium*, com diferentes doses de fertilizantes fosfatados em cana-de açúcar e observaram aumento na germinação e no rendimento da cana em solos aluviais.

Chabot *et al.* (1996) inocularam bactérias solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminosarum*, em alface e milho, e verificaram que a solubilização de fosfato por essas bactérias pareceu ser um mecanismo importante para a promoção de crescimento da planta em um solo moderadamente fértil e em outro muito fértil, por causa do aumento da disponibilidade do nutriente.

Em estudo realizado por Chagas Júnior *et al.* (2010) com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Wallp) na região Amazônica, observou-se que entre os rizóbios isolados de solos da Amazônia avaliados, 56% apresentaram capacidade para solubilização de fosfatos em meio de cultura, predominando baixos índices de solubilização. Dos isolados, oito proporcionaram teores de P acima de 1,17 g.kg⁻¹ de MS da parte aérea, resultando em melhor eficiência na utilização de P e eficiência simbiótica pelas plantas.

Trabalhos realizados por Souchie *et al.* (2005) com mudas de espécie arbórea inoculada com bactérias solubilizadoras de fosfato foram benéficas para formação de mudas de angico (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan), sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.) e acácia (*Acacia holosericea* A.Cunn. ex G.Don.). Entretanto, inibiram o desenvolvimento de tamboril (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong).

2.2.3 Produção de fitormônios por bactérias endofíticas

A produção de hormônios por bactérias endofíticas é relatada por diversos autores, principalmente a produção de auxinas, citocininas, etileno e giberelinas (GRAY e SMITH, 2005).

A capacidade de sintetizar auxinas é largamente observada em microrganismos do solo associados a plantas. Estimativas apontam que 80% das bactérias isoladas da rizosfera têm a capacidade de produzir auxinas reguladoras

do crescimento vegetal. As auxinas proporcionam o aumento do comprimento da raiz e do número de pelos e raízes laterais. Essas alterações morfológicas são devidas tanto pelo estímulo de resposta rápida (aumento na alongação celular) quanto pelo estímulo (divisão e diferenciação celular) nas plantas (DOBBELAERE *et al.*, 2003; RAVEN *et al.*, 2001).

A produção do ácido indol-3-acético (AIA), auxina mais relacionada à produção microbiana, é dependente do aminoácido triptofano, em sua maioria. Conforme Tsavkelova *et al.* (2006), o triptofano é convertido em AIA por várias rotas, como as rotas do ácido indol-3-pirúvico (AIP), da triptamina (TAM) e do ácido indol-3-acetonitrila (IAN). A rota do AIP é, provavelmente, a rota mais comum das vias dependentes do triptofano, envolvendo uma reação de desaminação para formação do AIP, uma reação de descarboxilação para formar o indol-3-aldeído, que sofre uma oxidação, para em seguida formar o AIA. A rota da TAM é semelhante à rota do AIP, porém ocorre primeiramente uma descarboxilação, seguida de desaminação pela ação das enzimas específicas. Na rota IAN, o triptofano é convertido a o indol-3-acetaldoxina, e então, a indol-3-acetonitrila.

Há produção bacteriana de AIA na ausência do triptofano, seguindo a via metabólica independente de triptofano, mais comum em plantas. Porém, a contribuição dessa via metabólica para a biossíntese de AIA é insignificante e os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos (TSAVKELOVA *et al.*, 2006).

Perrig *et al.* (2007) avaliaram o potencial de síntese de AIA das estirpes Cd e Az39 (*Azospirillum brasilense*) cultivadas em meio NFb sem L-triptofano por meio de cromatografia e observaram que a estirpe Cd produziu 10,8 µg AIA mL⁻¹, quantidade significativamente maior que a produzida por Az39 (2,9 µg mL⁻¹).

Didonet *et al.* (2003) inocularam linhagens de arroz com isolados de *Azospirillum* e observaram aumento na altura das plantas e aumento no comprimento das raízes e número de raízes secundárias, além de maior número de ramificações. Roesch *et al.* (2007) caracterizaram 224 isolados de *Azospirillum* spp. oriundos de raízes, colmos e solo rizosférico de plantas de arroz irrigado coletadas no Rio Grande do Sul, quanto à produção de AIA em meio sem L-triptofano. Dentre 224 isolados testados, 121 apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio e produzir auxina. Destes, 30 isolados foram mais promissores para a produção de ácido indol-3-acético, produzindo entre 3,51 a 246,49 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de AIA.

3 METODOLOGIA

3.1 Bactérias endofíticas

3.1.1 Obtenção de bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas utilizadas foram oriundas do levantamento realizado por Souza (2011) em bananeira “Prata-Anã”. Os dados da sequência parcial da região 16S rRNA das bactérias foram depositados na base de dados do EMBL/GenBank (TABELA 1).

TABELA 1. Isolados de bactérias endofíticas associadas à bananeira “Prata-Anã” utilizadas nos ensaios de fixação de nitrogênio (FBN), solubilização de fósforo insolúvel (SFI) e produção de ácido indol-3-acético (AIA).

Isolado	Gênero/espécie mais relacionado	FBN	SFI	AIA	Número de acesso no GenBank
EB-04	<i>Bacillus subtilis</i>	*	*	*	AY741264.1
EB-15	<i>Bacillus pumilus</i>		*	*	GQ917222.1
EB-23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*	*	*	JN201948.1
EB-24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	*	*	*	JF947357.1
EB-25	<i>Bacillus cereus</i>	*	*	*	GU451184.1
EB-26	<i>Bacillus methylotrophicus</i>		*	*	HM209756.1
EB-28	<i>Paenibacillus</i> sp.	*	*	*	EF178460.1
EB-30	<i>Bacillus axarquienses</i>		*	*	JF414764.1
EB-34	<i>Bacillus pumilus</i>		*	*	JN215511.1
EB-37	<i>Bacillus</i> sp.		*	*	JN215502.1
EB-38	<i>Bacillus</i> sp.	*	*	*	EU931559.1
EB-40	<i>Bacillus</i> sp.	*	*	*	GQ340516.1
EB-44	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		*	*	GU122948.1
EB-45	<i>Lysinibacillus</i> sp.	*	*	*	JN215512.1
EB-46	<i>Bacillus pumilus</i>		*	*	FJ236809.1
EB-47	<i>Bacillus</i> sp.	*	*	*	FJ611939.1
EB-49	<i>Bacillus licheniformis</i>	*	*	*	EU366371.1
EB-50	<i>Bacillus</i> sp.	*	*	*	HM769816.1
EB-51	<i>Bacillus pumilus</i>	*	*	*	HQ218993.1
EB-53	<i>Lysinibacillus</i> sp.		*	*	JN215512.1

continua...

TABELA 1. Cont.

Isolado	Gênero/espécie mais relacionado	FBN	SFI	AIA	Número de acesso no GenBank
EB-55	<i>Bacillus subtilis</i>		*	*	HQ334981.1
EB-56	<i>Bacillus</i> sp.	*	*	*	GU269573.1
EB-57	<i>Bacillus safensis</i>		*	*	JN092810.1
EB-58	<i>Bacillus pumilus</i>		*	*	JN082265.1
EB-60	<i>Lysinibacillus</i> sp.		*	*	JF906500.1
EB-63	<i>Bacillus pumilus</i>		*	*	GQ917222.1
EB-64	<i>Bacillus pumilus</i>	*	*	*	JF271873.1
EB-68	<i>Bacillus safensis</i>		*	*	JN092818.1
EB-71	<i>Bacillus</i> sp.	*	*	*	HM461161.1
EB-87	<i>Bacillus tequilensis</i>	*	*	*	HM770882.1
EB-88	<i>Bacillus flexus</i>	*	*	*	DQ870687.1
EB-126	<i>Bacillus subtilis</i>	*	*	*	HM769817.1
EB-127	<i>Sporolactobacillus</i> sp.	*	*	*	D16282.1
EB-133	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	*	*	*	AB301022.1
EB-136	<i>Bacillus subtilis</i>	*	*	*	AB301012.1
EB-144	<i>Paenibacillus</i> sp.	*	*	*	EF178460.1
EB-147	<i>Bacillus subtilis</i>		*	*	EU977724.1
EB-169	<i>Bacillus pumilus</i>	*	*	*	FJ189791.1
EB-194	<i>Bacillus</i> sp.	*	*	*	FJ405377.1
EB-196	<i>Enterobacter</i> sp.		*	*	GQ260081.1

* indica o isolado utilizado no ensaio.

Fonte: Souza (2011).

3.1.2 Preparo de suspensões bacterianas

As bactérias isoladas de raízes de bananeira cv. Prata-Anã foram mantidas em meio TSA (*Tryptic Soy Agar*), em tubos de ensaio por um período de 24 horas a 28 °C. Para a obtenção das suspensões bacterianas, realizou-se inoculação em meio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*), mantidas a 100 rpm em temperatura de 28 °C por um período de 48 horas.

Após esta etapa, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm para precipitação das células bacterianas. A ressuspensão foi realizada por meio da adição de solução salina a 0,85%, em condições assépticas de câmara de fluxo laminar. As concentrações de células bacterianas na suspensão foram ajustadas pela leitura da absorbância no comprimento de onda (λ) a 540 nm em espectrofotômetro, em densidade ótica (DO) igual a 1,0 ABS.

3.2 Fixação de nitrogênio *in vitro*

Avaliou-se o potencial de fixação de nitrogênio dos isolados bacterianos em ensaio *in vitro* pela sua capacidade de crescimento em meio semissólido NFb (DOBEREINER *et al.*, 1995), isento de nitrogênio. Para este ensaio, utilizaram-se somente os isolados que apresentaram o gene *nifH* (SOUZA, 2011) (TABELA 1), responsável por codificar a unidade Fe-nitrogenase do complexo nitrogenase (BUCHANAN *et al.*, 2000). O crescimento bacteriano neste meio ocorre se o isolado fixar biologicamente de nitrogênio, já que tais bactérias necessitam deste nutriente para seu crescimento e não há suprimento direto do mesmo, o que estimula os mecanismos de fixação do N₂ atmosférico para suprir essa necessidade.

O meio NFb foi composto por 5,0 g de ácido málico; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,02 g de CaCl₂.2H₂O; 2 mL de solução de micronutrientes (0,04 g de CuSO₄.5H₂O; 1,20 g de ZnSO₄.7H₂O; 1,40 g de

H₃BO₃; 1,00 g de Na₂MoO₄.2H₂O; 1,175 g de MnSO₄.H₂O; em um litro de solução); 2 mL de azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2 N KOH); 4mL de Fe-EDTA (solução a 1,64%); 1mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina; 20 mg de piridoxol-HCl; em 100 mL de solução); 4,5 g de KOH, para preparo de um litro de meio. O pH deste meio foi ajustado para 6,8 e acrescido 1,8 g de ágar, caracterizando o estado semissólido.

A suspensão bacteriana foi preparada pelo crescimento dos isolados em meio TSB por 48 horas, centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm e, posteriormente, lavados com solução salina a 0,85%. Durante o processo de preparo das suspensões bacterianas para este ensaio, a suspensão obtida foi novamente centrifugada para realizar a pré-lavagem das células bacterianas e eliminar resíduos de compostos nitrogenados.

Transferiram-se 5µL de suspensão bacteriana ajustadas (DO= 1,0 abs, λ= 540 nm) em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio NFb semissólido. Os tubos de ensaio foram incubados a 28 °C por sete dias. Após esse período, observou-se a presença de uma película aerotóxica típica próxima da superfície do meio. A presença da película aerotóxica é constituída de células bacterianas conforme descrito por Kuss *et al.* (2007). A mudança da coloração do meio de verde intenso para verde-azulado ou azul é indicador que a fixação biológica ocorreu, uma vez que esta ocorre pela redução do nitrogênio atmosférico em amônia (DOBEREINER *et al.*, 1995).

Os ensaios de fixação biológica de nitrogênio foram realizados em delineamento inteiramente casualizados, com 24 tratamentos e três repetições. A fixação de nitrogênio foi avaliada visualmente e os dados qualitativos foram submetidos à análise de distribuição de frequência.

3.3 Solubilização de fósforo

Para avaliar o potencial de solubilização de fósforo insolúvel pelos isolados bacterianos selecionados, utilizou-se a metodologia proposta por Katznelson e Bose (1959), com adaptações. Essa metodologia considera que a adição de fosfato insolúvel torna o meio turvo, e a habilidade dos isolados em solubilizar o fosfato inorgânico é determinada pela formação de halo claro ao redor de suas colônias.

Utilizou-se o meio de cultura meio LGI (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988) modificado por Saravanan *et al.* 2007 (LGI_m) suplementado com 5,0 g.L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂. Os reagentes do meio foram dissolvidos e o pH foi ajustado para 5,5 com a adição de ácido acético 0,5M. O meio foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos, em seguida 25 mL foram adicionados em cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro.

Após solidificação, inoculou-se 10 µL de suspensão bacteriana em três pontos equidistantes no meio. As placas foram incubadas em câmara incubadora (tipo BOD) a 28 °C por 15 dias, quando foi avaliada a presença do halo de solubilização.

Considerou-se a formação de halo claro como resposta positiva do isolado à solubilização de fosfato de cálcio. O diâmetro do halo de solubilização e da colônia bacteriana foi mensurado por meio do uso do paquímetro. Os dados foram utilizados para cálculo do índice de solubilização (IS), proposto por Berraqueiro *et al.* (1976). O IS foi determinado pela razão entre diâmetro do halo de solubilização e o diâmetro da colônia. A eficiência de solubilização foi estabelecida de acordo com a escala proposta por Silva Filho e Vidor (2000), em que índices inferiores a 1,0 são considerados de muito baixa solubilização; índices entre 1,0 e 2,0 são classificados como de baixa solubilização; índices

entre 2,0 e 3,0 apresentaram média solubilização; e índices acima de 3,0 possuem alta solubilização.

Os ensaios de solubilização de fósforo foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com 40 tratamentos, três repetições em que cada parcela experimental foi formada pela média dos valores das três inoculações realizadas por placa de Petri. Foram analisados os índices de solubilização e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008) e, quando significativos, foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparação das médias.

3.4 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

A produção de ácido 3-indol-acético (AIA) foi realizada por meio do uso da metodologia descrita por Kuss *et al.* (2007). Utilizou-se o meio TSA 10% suplementado com L-triptofano em solução com água destilada e filtrada com filtro tipo Millipore® 0,22µ para concentração final de 5mM de L-triptofano.

A suspensão bacteriana de cada um dos isolados bacterianos (TABELA 1) foram ajustadas conforme descrito no item 3.1.2. Aliquotas de 0,250 mL dessa suspensão foram inoculadas em 9,750 mL de meio de cultura, incubados por 48 horas a 28 °C sob agitação constante de 120 rpm, na ausência de luz, visto que este fitormônio é inativado por foto-oxidação. Após esse período, 2,0 mL de cada uma das culturas homogeneizadas foram transferidas para microtubos tipo Eppendorf de 2,0 mL e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio de 15,0 mL sendo adicionados 2,0 mL de reagente de Salkowski (SARWAR e KREMER, 1995).

Os frascos foram incubados por pelo menos 30 minutos em ambiente escuro. A produção de AIA foi avaliada pela presença da coloração rosa nos frascos.

Realizou-se ensaio da capacidade de síntese de AIA por via alternativa ao triptofano, onde os isolados que apresentaram capacidade de síntese de AIA em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano foram inoculados em meio TSA 10% não suplementado. Realizou-se a mesma análise de produção de AIA utilizada para o ensaio de produção de AIA em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano.

A avaliação quantitativa de AIA foi realizada pela intensidade da cor por leitura da absorbância das amostras com o auxílio do espectrofotômetro em densidade ótica de 530 nm de comprimento de onda.

Determinou-se a concentração de AIA pela absorbância em espectrofotômetro de meio de cultura esterilizado não inoculado com concentrações conhecidas de AIA comercial de 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que foi normalizada em curva-padrão, gerando a equação para determinar a concentração de AIA das amostras. Para determinar o teor de AIA em meio suplementado com L-triptofano, utilizou-se a equação $Y = 34,987x - 0,9686$ ($R^2=98,95\%$), na qual “Y” é a concentração de AIA, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e “x” é a absorbância obtida durante as leituras no espectrofotômetro. Para determinar o teor de AIA em meio sem suplemento de L-triptofano, utilizou-se a equação $Y = 35,417x - 0,0394$ ($R^2=98,75\%$).

Cada ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 40 tratamentos e três repetições. Foram analisados níveis de produção de AIA e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008) e, quando significativos, foram submetidos ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparação das médias.

4 RESULTADOS

4.1 Fixação de nitrogênio *in vitro*

A capacidade de fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias endofíticas foi determinada pela presença de película aerotóxica típica próxima à superfície do meio livre de nitrogênio (FIGURA 1). Nos isolados que apresentaram o crescimento da película foi observada a capacidade de mudança da coloração do meio de cultura de verde para azul (FIGURA 2).

Em virtude da subjetividade da determinação da eficiência de fixação de nitrogênio pela alteração de coloração do meio de cultura, utilizou-se somente a formação da película aerotóxica como característica determinante da capacidade de fixação de nitrogênio.

Dentre os 24 isolados utilizados no ensaio de fixação de nitrogênio, 83% apresentaram a capacidade de crescimento e formação de película aerotóxica (TABELA 2). Dos 20 isolados que apresentaram formação da película, 19 pertencem ao filo Firmicutes e apenas a espécie *Klebsiella pneumoniae* pertence ao filo Gammaproteobacteria.

A espécie *Bacillus thuringiensis* (EB-24), dois isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. (EB-38 e EB-71) e um isolado do gênero *Paenibacillus* sp. (EB-28) não fixaram nitrogênio em meio livre de N. Dos 24 isolados avaliados, 19 pertencem ao gênero *Bacillus* sp. e dentre estes 84,3% dos isolados apresentaram a capacidade de formação da película (TABELA 2).

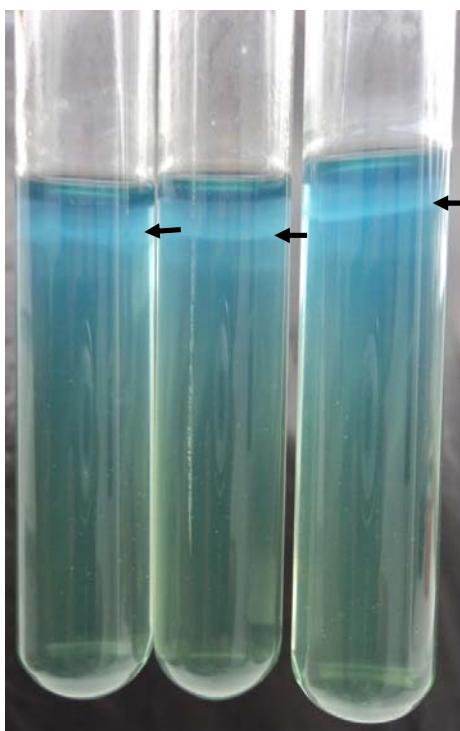


FIGURA 1. Película aerotáxica (seta) típica produzida por microrganismos diazotróficos em meio livre de nitrogênio (NFb).

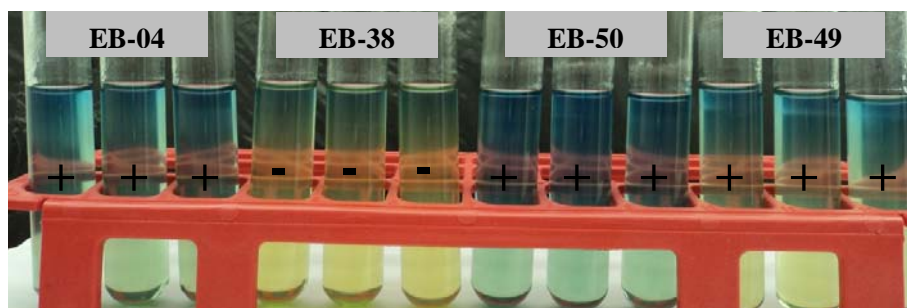


FIGURA 2. Alteração na coloração verde para azul do meio livre de nitrogênio (NFb) em isolados de bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”.

TABELA 2. Detecção da formação de película aerotóxica por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”.

Isolado	Gênero/espécie	Presença de película
EB-133	<i>Bacillus amiloliquefaciens</i>	+
EB-25	<i>Bacillus cereus</i>	+
EB-88	<i>Bacillus flexus</i>	+
EB-49	<i>Bacillus licheniformis</i>	+
EB-51	<i>Bacillus pumilus</i>	+
EB-64	<i>Bacillus pumilus</i>	+
EB-169	<i>Bacillus pumilus</i>	+
EB-38	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-71	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-40	<i>Bacillus</i> sp.	+
EB-47	<i>Bacillus</i> sp.	+
EB-50	<i>Bacillus</i> sp.	+
EB-56	<i>Bacillus</i> sp.	+
EB-194	<i>Bacillus</i> sp.	+
EB-04	<i>Bacillus subtilis</i>	+
EB-126	<i>Bacillus subtilis</i>	+
EB-136	<i>Bacillus subtilis</i>	+
EB-87	<i>Bacillus tequilensis</i>	+
EB-24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
EB-23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
EB-45	<i>Lysinibacillus</i> sp.	+
EB-28	<i>Paenibacillus</i> sp.	-
EB-144	<i>Paenibacillus</i> sp.	+
EB-127	<i>Sporolactobacillus</i> sp.	+

+ Formação de película aerotóxica típica;

- Sem formação de película aerotóxica típica.

4.2 Solubilização de fosfato de cálcio

A formação de halos de solubilização em meio sólido LGI_m suplementado com fosfato de cálcio tribásico [Ca₃(PO₄)₂] foi utilizada como parâmetro para avaliar o potencial de solubilização de fosfato de cálcio por bactérias endofíticas isoladas de bananeira “Prata-Anã” (FIGURA 3). Colônias bacterianas que foram capazes de formar halos mensuráveis foram consideradas solubilizadoras de fosfato de cálcio.

Dos 40 isolados avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato insolúvel *in vitro*, 15 (37,5%) foram capazes de solubilizar o fosfato (TABELA 3).

Diferentes espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentaram capacidade de solubilização de fosfato de cálcio insolúvel, dentre as quais *Bacillus axarquienses*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. safensis*, *B. flexus* e *B. subtilis*. A solubilização de fosfato também foi positiva para dois isolados pertencentes ao gênero *Lysinibacillus* sp. e um isolado do gênero *Paenibacillus* sp.

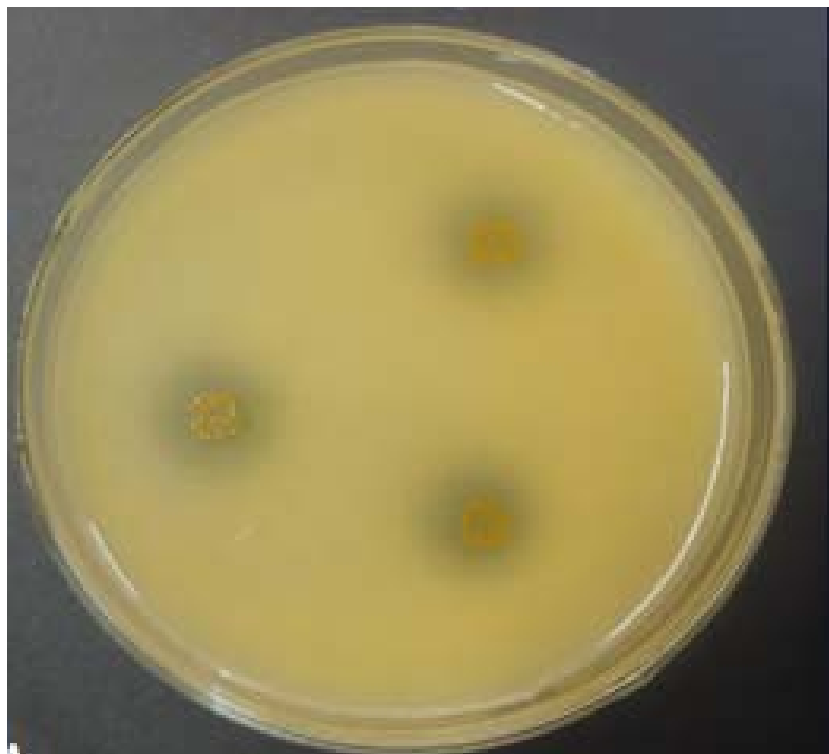


FIGURA 3. Halo de solubilização formado em meio LGI_m suplementado com fosfato de cálcio tribásico $[Ca_3(PO_4)_2]$, pela bactéria endofítica EB-126, isolada de raízes de bananeira “Prata-Anã”.

TABELA 3. Solubilização de fosfato de cálcio tribásico [Ca₃(PO₄)₂] em meio LGI_m por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira.

Isolado	Gênero/espécie	Solubilização
EB-44	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+
EB-133	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-
EB-30	<i>Bacillus axarquienses</i>	-
EB-25	<i>Bacillus cereus</i>	-
EB-88	<i>Bacillus flexus</i>	+
EB-49	<i>Bacillus licheniformis</i>	-
EB-26	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	-
EB-34	<i>Bacillus pumilus</i>	+
EB-51	<i>Bacillus pumilus</i>	+
EB-63	<i>Bacillus pumilus</i>	+
EB-64	<i>Bacillus pumilus</i>	+
EB-15	<i>Bacillus pumilus</i>	-
EB-46	<i>Bacillus pumilus</i>	-
EB-58	<i>Bacillus pumilus</i>	-
EB-169	<i>Bacillus pumilus</i>	-
EB-57	<i>Bacillus safensis</i>	+
EB-68	<i>Bacillus safensis</i>	+
EB-38	<i>Bacillus</i> sp.	+
EB-47	<i>Bacillus</i> sp.	+
EB-37	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-40	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-50	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-56	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-71	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-194	<i>Bacillus</i> sp.	-
EB-126	<i>Bacillus subtilis</i>	+
EB-147	<i>Bacillus subtilis</i>	+
EB-04	<i>Bacillus subtilis</i>	-
EB-55	<i>Bacillus subtilis</i>	-
EB-136	<i>Bacillus subtilis</i>	-
EB-87	<i>Bacillus tequilensis</i>	-
EB-24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
EB-196	<i>Enterobacter</i> sp.	-
EB-23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
EB-53	<i>Lysinibacillus</i> sp.	+

continua...

TABELA 3. Cont.

Isolado	Gênero/espécie	Solubilização
EB-60	<i>Lysinibacillus</i> sp.	+
EB-45	<i>Lysinibacillus</i> sp.	-
EB-28	<i>Paenibacillus</i> sp.	+
EB-144	<i>Paenibacillus</i> sp.	-
EB-127	<i>Sporolactobacillus</i> sp.	-

+ Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico em meio LGI_m;
- Incapacidade de solubilizar fosfato inorgânico em meio LGI_m;

Entre os isolados testados houve diferença estatística significativa pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) para diâmetro de colônia e diâmetro do halo (FIGURA 4).

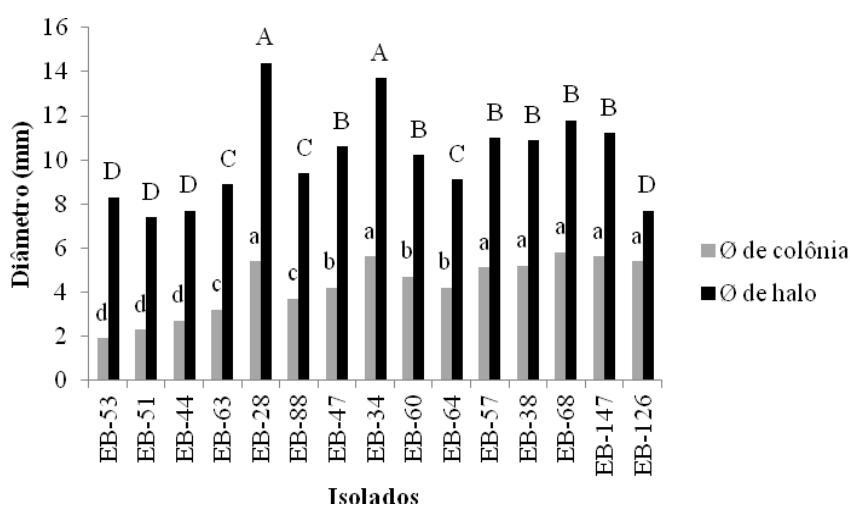


FIGURA 4. Valores médios de diâmetro de colônia (Ø de colônia) e de halo de solubilização de fosfato (Ø de halo), em mm, em meio LGI_m suplementado com fosfato de cálcio tribásico $[Ca_3(PO_4)_2]$ por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”. Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas distintas diferem entre si em diâmetro de halo e de colônia, respectivamente, pelo teste de Scott-knott a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

O maior diâmetro de colônia foi obtido no isolado EB-68 (*B. safensis*), com média de 5,8 mm, enquanto o menor diâmetro da colônia foi observado para o isolado EB-53 (*Lysinibacillus* sp.), com média de 1,9 mm. A variação também foi constatada entre os isolados para a característica de diâmetro de halo de solubilização. O isolado EB-51 (*B. pumilus*) apresentou média de 7,4 mm,

enquanto para o isolado EB-28 (*Paenibacillus* sp.) foi registrada média de 14,4 mm (FIGURA 4).

A eficiência na solubilização do fosfato de cálcio foi calculada conforme a metodologia proposta por Berraqueiro *et al.* (1976) pela razão entre o diâmetro do halo de solubilização e o diâmetro da colônia bacteriana. A escala de eficiência proposta por Silva Filho e Vidor (2000) foi utilizada para estudos da eficiência de solubilização dos isolados por meio de seus índices de solubilização, de modo que índices inferiores a 1,00 são considerados de muito baixa solubilização (MB); índices que variam entre 1,00 e 2,00 são classificados como de baixa solubilização (BS); índices entre 2,00 e 3,00 apresentam média solubilização (MS); e os índices superiores a 3,00 possuem alta solubilização (AS).

Os isolados avaliados apresentaram índices de solubilização variando de muito baixa solubilização, com média de 0,42 obtida pelo isolado EB-126 (*B. subtilis*), à alta solubilização, com média de 3,56 encontrada no isolado EB-53, pertencente ao gênero *Lysinibacillus* sp. (TABELA 4). Mais de 70% dos isolados avaliados apresentaram índice de baixa solubilização e apenas dois isolados (EB-51 e EB-44) foram classificados como de média solubilização de fosfato de cálcio.

TABELA 4. Valores médios dos índices de solubilização (IS) em meio LGI_m suplementado com fosfato de cálcio tribásico [Ca₃(PO₄)₂] por bactérias endofíticas isoladas de bananeira “Prata-Anã” e suas classificações pela escala de eficiência.

Isolado	Gênero/espécie mais relacionado	Índice de solubilização	
		IS	Classificação*
EB-53	<i>Lysinibacillus</i> sp.	3,56 a	AS
EB-51	<i>Bacillus pumilus</i>	2,28 b	MS
EB-44	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2,08 b	MS
EB-63	<i>Bacillus pumilus</i>	1,94 b	BS
EB-28	<i>Paenibacillus</i> sp.	1,76 c	BS
EB-88	<i>Bacillus flexus</i>	1,70 c	BS
EB-47	<i>Bacillus</i> sp.	1,49 c	BS
EB-34	<i>Bacillus pumilus</i>	1,48 c	BS
EB-60	<i>Lysinibacillus</i> sp.	1,21 d	BS
EB-64	<i>Bacillus pumilus</i>	1,21 d	BS
EB-57	<i>Bacillus safensis</i>	1,16 d	BS
EB-38	<i>Bacillus</i> sp.	1,09 d	BS
EB-68	<i>Bacillus safensis</i>	1,06 d	BS
EB-147	<i>Bacillus subtilis</i>	1,03 d	BS
EB-126	<i>Bacillus subtilis</i>	0,42 e	MB

Médias seguidas de letras distintas, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste P (P<0,05).

* AS – alta solubilização / MS – média solubilização / BS – baixa solubilização / MB – muito baixa solubilização. Classificação de Silva Filho e Vidor (2000).

4.3 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

Houve produção de ácido indol-3-acético (AIA) pelas bactérias endofíticas. A determinação da capacidade de síntese de ácido indol-3-acético (AIA) foi determinada pela reação de oxidação do meio de cultura com a adição de reagente de Salkowski (SARWAR e KREMER, 1995) (FIGURA 5).



FIGURA 5. Alteração do meio de cultura na presença de bactérias endofíticas produtoras de ácido indol-3-acético (AIA) (Coloração rósea positiva para produção de AIA).

A capacidade de produção de AIA em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano foi observada em 40% dos isolados bacterianos (16) e, destes, sete isolados foram capazes de produzir AIA por via alternativa ao triptofano em meio TSA 10% sem suplementação deste aminoácido (TABELA 5).

Dentre os isolados que demonstraram a capacidade de sintetizar AIA em meio suplementado com L-triptofano, 11 isolados pertencem ao gênero *Bacillus* sp., dois são do gênero *Lysinibacillus* sp., e apenas um representante dos gêneros *Paenibacillus* sp. e *Klebsiella* sp.

Isolados dos gêneros *Bacillus* sp. (EB-38 e EB-40) e *Lysinibacillus* sp. (EB-45) e as espécies *B. methylotrophicus* (EB-26), *B. subtilis* (EB-04 e EB-55) e *B. tequilensis* (EB-87) apresentaram capacidade de sintetizar AIA tanto por via dependente de triptofano quanto por via alternativa.

Os isolados que apresentaram a capacidade de síntese de AIA em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano e em meio TSA 10% na ausência de L-triptofano foram estatisticamente diferentes a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott para o teor de AIA (FIGURA 6).

TABELA 5. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”, em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano (Trp) e sem suplementação.

Isolado	Gênero/espécie	Produção de AIA	
		TSA 10% com Trp	TSA 10% sem Trp
EB-44	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-
EB-133	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+	-
EB-30	<i>Bacillus axarquenses</i>	-	-
EB-25	<i>Bacillus cereus</i>	-	-
EB-88	<i>Bacillus flexus</i>	-	-
EB-49	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	-
EB-26	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	+	+
EB-34	<i>Bacillus pumilus</i>	+	-
EB-51	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
EB-63	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
EB-64	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
EB-15	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
EB-46	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
EB-58	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
EB-169	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-
EB-57	<i>Bacillus safensis</i>	-	-
EB-68	<i>Bacillus safensis</i>	-	-
EB-38	<i>Bacillus</i> sp.	+	+
EB-47	<i>Bacillus</i> sp.	+	-
EB-40	<i>Bacillus</i> sp.	+	+
EB-56	<i>Bacillus</i> sp.	+	-
EB-50	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
EB-37	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
EB-71	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
EB-194	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
EB-126	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
EB-55	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
EB-04	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
EB-147	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
EB-136	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
EB-87	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	+
EB-24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-

continua...

TABELA 5. Cont.

Isolado	Gênero/espécie	Produção de AIA	
		TSA 10% com Trp	TSA 10% sem Trp
EB-196	<i>Enterobacter</i> sp.	-	-
EB-23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-
EB-53	<i>Lysinibacillus</i> sp.	+	-
EB-45	<i>Lysinibacillus</i> sp.	+	+
EB-60	<i>Lysinibacillus</i> sp.	-	-
EB-28	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	-
EB-144	<i>Paenibacillus</i> sp.	-	-
EB-127	<i>Sporolactobacillus</i> sp.	+	-

+ Capacidade de produção de ácido indol-3-acético;
 - Incapacidade de produção de ácido indol-3-acético;

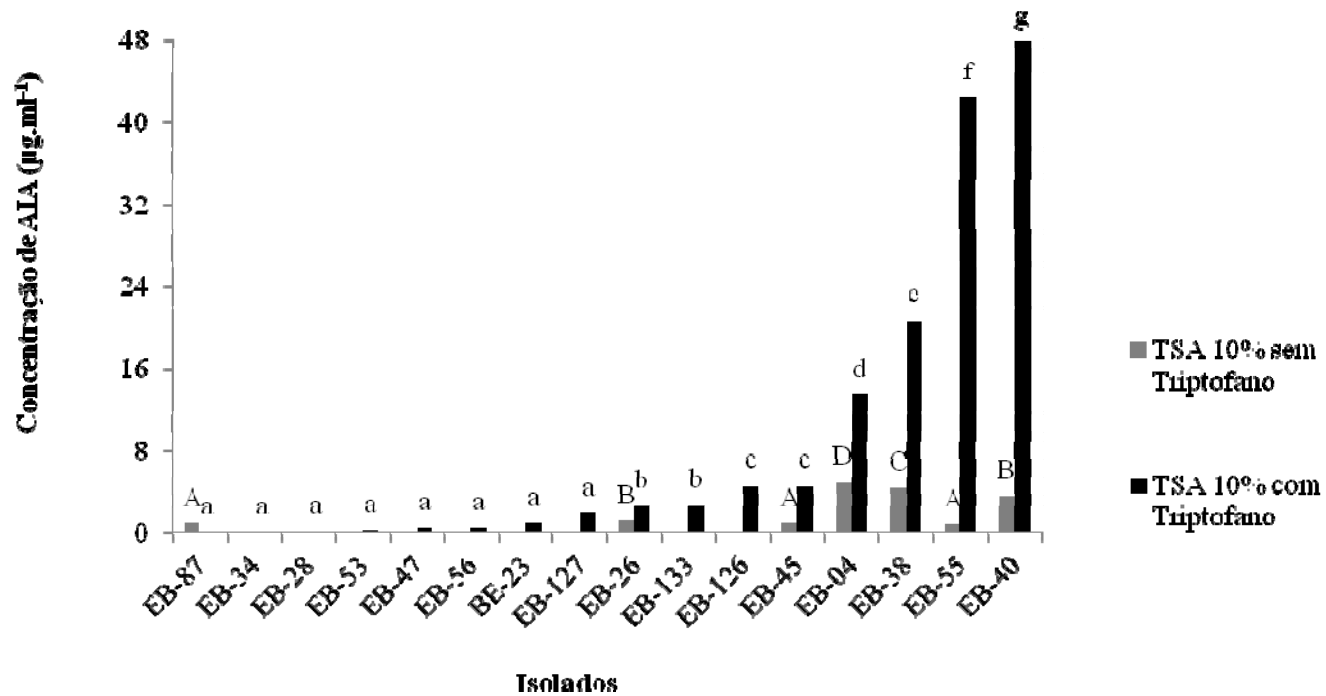


FIGURA 6. Valores médios de concentração de ácido indol-3-acético ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) em meio TSA 10%, com e sem suplementação de L-tryptofano, por bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira “Prata-Anã”. Médias seguidas de letras maiúsculas e minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Os isolados apresentaram grande variação de síntese de AIA em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano. O isolado do gênero *Bacillus* sp. (EB-40) apresentou maior concentração de AIA, com média de 47,88 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, enquanto o isolado da espécie *B. tequilensis* (EB-87) apresentou a menor concentração de AIA, com média de 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (FIGURA 6).

Dentre os isolados que apresentaram capacidade de síntese de AIA em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano, aproximadamente 44% sintetizaram teores inferiores a 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, dentre eles isolados dos gêneros *Bacillus* sp. (EB-47 e EB-56), *Lysinibacillus* sp. (EB-53), *Paenibacillus* sp. (EB-28) e das espécies *K. pneumoniae* (EB-23), *B. pumilus* (EB-34) e *B. tequilensis* (EB-87).

Variação na síntese de AIA também foi observado entre os isolados cultivados em meio TSA 10% sem L-triptofano. A síntese de AIA variou de 0,80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pelo isolado EB-55 (*B. subtilis*) a 4,39 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pelo isolado EB-04 (*Bacillus* sp.) (FIGURA 6).

5 DISCUSSÃO

Os isolados de bactérias endofíticas avaliadas apresentaram diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal demonstrando o potencial de uso como biofertilizantes na cultura da bananeira “Prata-Anã”.

De acordo com Lodewyckx *et al.* (2002), as bactérias promotoras de crescimento das plantas podem afetar o crescimento de maneira direta ou indireta, com destaque aos mecanismos de ação direta como a fixação de nitrogênio atmosférico (KUSS *et al.*, 2007; PERIM *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2007), síntese de diferentes fitormônios (CASSAN *et al.*, 2001; BASTIAN *et al.*, 1998; BOTTINI *et al.*, 1989) e solubilização de minerais (BAGYARAJ *et al.*, 2000; KHAN *et al.*, 2009; THAZIN *et al.*, 2011).

A existência de diferentes gêneros de bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio em bananeira tem sido relatada por diversos autores (WEBER *et al.*, 1999, CRUZ *et al.*, 2001, MARTINEZ *et al.*, 2003). No presente estudo cinco diferentes gêneros, *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Lysinibacillus* sp., *Paenibacillus* sp. e *Sporolactobacillus* sp., apresentaram a capacidade de formação da película aerotáxica. Embora todos os isolados avaliados tenham apresentado amplificação para o gene *nifH* (SOUZA, 2011), quatro isolados não revelaram a capacidade de fixação de nitrogênio *in vitro*.

O uso do gene *nifH* é tido como marcador determinante em bactérias diazotróficas uma vez que esse gene é funcional com alta correlação entre a estrutura e a função microbiana e tem sido considerado uma região altamente conservada do genoma dessas bactérias (ROSADO *et al.*, 1999). Contudo, a fixação biológica de nitrogênio é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominado *nif* (*Nitrogen Fixation*), os quais codificam as diversas proteínas envolvidas no processo, bem como regulam a expressão gênica destas (TEIXEIRA, 1997). Essa complexidade existente nos

genes *nif* pode justificar o fato de quatro isolados não apresentarem a fixação biológica de nitrogênio em meio NFb.

Apesar de o meio NFb ter sido descrito inicialmente por Dobereiner *et al.* (1995) para o isolamento de espécies do gênero *Azospirillum*, proporcionou condições físico-químicas para o crescimento e caracterização dos isolados bacterianos dele provenientes das raízes de bananeira. KUSS *et al.* (2007) relatam também a eficiência do meio para o isolamento de bactérias diazotróficas de diversos outros gêneros. Segundo os autores, os indivíduos são selecionados por apresentarem necessidades nutricionais semelhantes ao gênero *Azospirillum*. Além deste, outros meios são descritos por Dobereiner *et al.* (1995) para isolamento de bactérias diazotróficas, como o meio JNFb (isolamento de *Herbaspirillum* spp.), JMV (isolamento de *Burkholderia* spp.), LGI (isolamento de *Azospirillum amazonense*) e LGI-P (isolamento de *Gluconacetobacter* spp.). Entretanto, esses meios de cultura também são específicos para determinadas espécies (DOBEREINER *et al.*, 1995) e são pouco utilizados em trabalhos de seleção de bactérias diazotróficas de espécies diferentes daquelas para as quais foram desenvolvidas.

Sete diferentes espécies do gênero *Bacillus* sp. foram capazes de crescer em meio NFb. Teixeira *et al.* (2007) identificaram 47 diferentes espécies em *Manihot esculenta* L. e apenas 18 linhagens, representantes das espécies *B. cereus*, *B. pumilus* e *B. megaterium*, foram capazes de crescer em meio NFb. Estudos conduzidos em milho também demonstraram que bactérias dos gêneros *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp. e *Paenibacillus* sp. são capazes de crescer em meio NFb, demonstrando atividade diazotrófica (CERIGIOLI, 2005; IKEDA, 2010).

Espécies do gênero *Paenibacillus* sp. podem contribuir para o desenvolvimento e crescimento vegetal além da sua utilização como agentes de controle biológico de fitopatógenos (SIDDIQUI e MAHMOOD, 1999; LACEY *et al.*, 2001).

Isolados endofíticos de coco, do gênero *Lysinibacillus* sp, *Paenibacillus* sp. e *Ochrobactrum* sp., apresentaram atividade diazotrófica em meio deficiente de N (REGHUVARAN *et al.*, 2012). Isolados de *Lysinibacillus sphaericus* foram capazes, também, de sintetizar protease *in vitro* (COSTA, 2010) e *Lysinibacillus mangiferahumii* apresentou a capacidade de produzir nematicidas voláteis (YANG *et al.*, 2012). *Sporolactobacillus* sp. é comumente conhecido pela sua capacidade de produzir ácido láctico (CHANG *et al.*, 2008; FUJITA *et al.*, 2010; KITAHARA e SUZUKI, 1963).

Apesar de a amplificação do gene *nifH* e a formação da película aerotóxica em meio NFb serem consideradas como bons indicadores da capacidade de fixação de nitrogênio, testes mais específicos deverão ser realizados com intuito de confirmar a efetividade dos isolados com potencial biotecnológico para fornecimento de nitrogênio.

Contudo, o potencial de fixação biológica de N depende da interação das bactérias com o genótipo da planta, dos fatores abióticos do meio e da competitividade com os demais microrganismos do local. Mantelin e Touraine (2004) consideram que a fixação ativa de N₂ pelas bactérias não implica transferência do N fixado para a planta. Han e New (1998) verificaram, em seus experimentos, que a FBN em meio de cultura não se relacionou com alta fixação de N₂ em campo. Este fato está relacionado à necessidade de utilização do N fixado pelo próprio microrganismo para manter as suas atividades metabólicas (SIQUEIRA *et al.*, 1999).

A ocorrência de bactérias endofíticas com a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos é conhecida desde o início do século XX (KUCEY *et al.*, 1988). Desde então inúmeros estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de isolar e identificar os microrganismos, bem como elucidar os mecanismos associados à solubilização de P (BARROSO *et al.*, 2001; INUI, 2009; RODRIGUES e FRAGA, 1999; SILVA *et al.*, 2011; SOUCHIE, 2005).

Nos ensaios realizados, seis diferentes espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* sp., dois isolados do gênero *Lysinibacillus* sp. e um do gênero *Paenibacillus* sp. foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio. Gyaneshwar *et al.* (2002) relatam que a maioria dos microrganismos solubilizadores de fosfato solubilizam complexos Ca-P e somente um pequeno número pode solubilizar os complexos Fe-P e Al-P. Esses microrganismos podem ser efetivos em solos calcários em que complexos Ca-P estão presentes.

Cunningham e Kuyack (1992) preconizam que outros componentes do meio também podem afetar a capacidade de solubilização de fosfatos dos microrganismos. Silva Filho e Vidor (2000) verificaram que microrganismos solubilizadores possuem melhores desempenhos em meios com glicose, frutose, sacarose ou xilose. Porém, os resultados de crescimento e solubilização de fosfatos foram altamente variáveis entre os indivíduos, principalmente, pela alta variabilidade dentro deste grupo estudado, nos quais características e necessidades nutricionais intrínsecas dos isolados permitiram maior ou menor crescimento e solubilização de acordo com a fonte de carbono utilizada.

Outro fator que pode influenciar na habilidade de solubilização de P está associado à natureza da fonte de N que é adicionada ao meio de cultura. Gyaneshwar *et al.* (2002) relatam que há maior solubilização na presença de sais de amônio do que quando na presença de sais de nitrato. Roos e Luckner (1984) atribuem a maior solubilização de fosfatos pela extrusão de prótons que ocorre nesses microrganismos para compensar a absorção de amônio, levando a uma redução do pH extracelular, favorecendo a solubilização de fosfatos.

Rodriguez e Fraga (1999) avaliaram isolados dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Citrobacter* quanto à solubilização em meio líquido suplementado com fosfato de cálcio tribásico. Os resultados destacaram a espécie *B. amyloliquefaciens* que apresentou maior acúmulo de fósforo solubilizado. Assumpção *et al.* (2009), ao isolarem bactérias endofíticas

de sementes de soja, demonstraram a capacidade dos isolados dos gêneros *Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp. quanto à solubilização de fosfato de cálcio tribásico em meio tipo Verma. As espécies *B. tequilensis* e *B. cereus* também demonstraram a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio tribásico em meio líquido NBRIP (BAIG *et al.*, 2011).

Poucos são os trabalhos que utilizaram índice de solubilização como critério de avaliação da eficiência de solubilização. O uso de índices de solubilização demonstra ser mais eficiente que a solubilização de fosfato em meio líquido para determinar o potencial de solubilização dos microrganismos. Deve-se considerar que um maior teor de fósforo solubilizado pode ser alcançado devido a uma maior taxa de crescimento microbiológica; entretanto, a eficiência depende da exigência dos microrganismos por fósforo. Souza (2010) preconiza que os meios líquidos proporcionam melhores condições para bactérias solubilizadoras de fósforo atuar nos fosfatos insolúveis, sendo mais eficientes para selecionar bactérias com alto potencial de solubilização.

A variação no índice de solubilização de fosfato de 0,42 a 3,56, observada pelos isolados EB-126 (*B. subtilis*) e EB-53 (*Lysinibacillus* sp.), é similar a outros relatos na literatura. Santos *et al.* (2012), ao avaliarem, em cana-de-açúcar, 15 isolados de bactérias endofíticas e 15 isolados de rizobactérias, constataram médias que variaram entre 1,00 a 2,33 nas bactérias endofíticas e 1,21 a 3,48 em rizobactérias. Souza (2010), ao estudar a eficiência de solubilização de isolados bacterianos, obteve índices de solubilização variando de 1,00 a 4,06 em meio NBRIP sólido e 0,67 a 2,76 em meio Verma.

Todos os isolados utilizados nos ensaios de solubilização de P foram coletados a partir de raízes de bananeiras. Barea *et al.* (2005) relatam que microrganismos solubilizadores de fosfato que habitam a rizosfera são, na sua maioria, metabolicamente mais ativos que isolados de outros nichos, uma vez que esta região sofre intensa influência de exsudatos radiculares enriquecendo a

região rizosférica com fontes de carbono prontamente disponíveis aos microrganismos do solo (TAURIAN *et al.*, 2010; ZILLI *et al.*, 2003).

A solubilização de P demonstrada neste trabalho é de microrganismos endofíticos (SOUZA, 2011). Assim, a ação desses microrganismos pode estar associada à produção de ácidos orgânicos ou fosfatases que, associadas aos exsudatos radiculares, podem atuar na solubilização de P na zona de depleção da raiz (GYANESHWAR *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2000 NAUTIYAL, 1999; VAZQUEZ *et al.*, 2000; VASSILEV e VASSILEVA, 2003).

A ação dos reguladores de crescimento produzidos por bactérias endofíticas vem sendo estudada em diversas espécies de plantas (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009; CERIGIOLI, 2005; PHETCHARAT e DUANGPAENG, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2007; TSAVKELOVA *et al.*, 2007). De acordo com Lodewyckx *et al.* (2002), a síntese de fitormônios é caracterizada como um mecanismo de ação direta na promoção do crescimento em plantas. Dentre os fitormônios, o ácido-3-indol-acético tem sido um dos mais estudados e, conforme diversos autores esse regulador é capaz de promover o incremento do tamanho e distribuição das raízes, resultando em uma maior absorção de nutrientes e água do solo (SOBRAL *et al.*, 2004, LEE *et al.*, 2004). De maneira indireta, o hormônio AIA também atua nas reações relacionadas à defesa vegetal, inibindo a germinação de esporos e de crescimento micelial de fungos patogênicos (BROWN e HAMILTON, 1992; HAHN e STRITTMATTER, 1994).

A biossíntese de auxinas por bactérias acontece por diferentes rotas metabólicas (SPAEPEN *et al.*, 2007), sendo o triptofano o principal precursor para a síntese de AIA. Os isolados que sintetizam AIA tanto por via dependente quanto por independente de L-triptofano apresentaram maiores valores quando da presença do aminoácido.

Apesar de o método colorimétrico de Salkowski ser questionado quanto à sua confiabilidade (CROZIER *et al.*, 1988; FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 1993), Balota *et al.* (1997) relatam alta correlação entre este método e o método de determinação de AIA por HPLC. No presente trabalho, o método colorimétrico foi eficiente na determinação de AIA em concentrações variáveis de padrão.

Dentre os isolados avaliados em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano, quatro apresentaram a capacidade de produzir concentrações superiores a 10 µg ml⁻¹ de AIA. Destaca-se o isolado EB-40, do gênero *Bacillus* sp., que apresentou média de 47,88 µg.ml⁻¹ de AIA. Esse isolado também foi capaz de sintetizar nitrogênio *in vitro*, no entanto, não demonstrou capacidade de solubilização de P. Dos isolados estudados, apenas dois, EB-126 (*Bacillus subtilis*) e EB-47 (*Bacillus* sp) apresentaram capacidade simultânea para fixação de N *in vitro*, solubilização de P e produção de auxina em meio TSA 10% suplementado com L-triptofano. Em torno de 25% dos isolados apresentaram a capacidade de fixar N *in vitro* e sintetizar AIA, e 17,5% foram caracterizados pela produção simultânea de AIA e solubilização de fosfato.

Várias espécies do gênero *Bacillus* são relatadas como promotoras de crescimento vegetal por sintetizar auxinas, principalmente o ácido indol-3-acético, solubilizar fosfatos insolúveis, produzir sideróforos ou fixar nitrogênio atmosférico (ARAUJO *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2012; MANJULA e PODILE, 2005; PERSELLO-CARTIEAUX *et al.*, 2003; PHETCHARAT & DUANGPAENG, 2012; TSAVKELOVA *et al.*, 2006).

Os resultados do presente estudo demonstraram que os isolados avaliados apresentaram versatilidade no metabolismo para fixação de N, solubilização de fosfato e produção de AIA. Diante destes resultados, estudos adicionais deverão ser conduzidos com o intuito de comprovar a eficiência desses microrganismos como promotores do crescimento de plantas.

6 CONCLUSÕES

Vinte isolados testados fixam nitrogênio e, destes, 19 são do gênero *Bacillus* sp.

Quinze isolados apresentam capacidade de solubilização de fosfato de cálcio tribásico e o isolado EB-53 do gênero *Lysinibacillus* sp. apresenta alta solubilização, com índice de solubilização de 3,56.

Dezesseis isolados apresentam capacidade de sintetizar ácido indol-3-acético em presença de L-triptofano e sete apresentam essa capacidade na ausência de L-triptofano. Destas, o isolado EB-40 do gênero *Lysinibacillus* sp. possui maior capacidade de sintetizar ácido indol-3-acético *in vitro*.

Os isolados EB-126 (*Bacillus subtilis*) e EB-47 (*Bacillus* sp.) apresentam capacidade simultânea para fixação de N *in vitro*, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C.O. *et al.* Aspectos socioeconômicos. In: CORDEIRO, Z.J.M. **Banana produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia, 2000, p. 10-11.
- AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p. 565-568, 2002.
- ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 184 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.
- ARAÚJO, F. F. *et al.* Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa-MG, v. 41, n. 3, p. 521-527, 2012.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology Technology**, Piracicaba, v. 43, p. 447-451, 2000.
- ARAÚJO, W.L.; *et al.* Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, p. 229-236, 2001.
- ARNOU, D. I. **Soil and fertilizer phosphorus in crop nutrition**. 4 ed. New York: Academic Press, 1953.
- ASSUMPÇÃO, L. C. *et al.* Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 3, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N. DESHMUKH, S. K. (Ed.) **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. p. 189-207.

BAGYARAJ, D. J. *et al.* Mineral phosphate solubilization: agronomic implications, mechanisms and molecular genetics. **Proceedings of Indian National Science Academy**, New Delhi, n. 2-3, p. 69-82, 2000.

BAIG, K. S. *et al.* Comparative effectiveness of *Bacillus* spp. possessing either dual or single growth-promoting traits for improving phosphorus uptake, growth yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 191, n. 5, p. 415-424, 2009.

BAIS, H. P. *et al.* The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l.], n. 57, p. 233-266, 2006

BALDANI, J.I.; BALDANI V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDOTTO, L. E. B. *et al.* Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, v. 34, p. 349-360. 2010

BALOTA, E. L. *et al.* Avaliação da produção *in vitro* de ácido indol acético por bactérias diazotróficas pelo método colorimétrico e em HPLC. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 40, n. 2, p. 435-491, jun. 1997.

BAREA, J. M. *et al.* Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 56, p. 1761-1778, 2005.

BARROSO, C. B. *et al.* Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio nas raízes de plantas na Amazônia Brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Viçosa-MG, v. 25, n. 3, p. 575-581, 2001.

BASTIAN, F. *et al.* Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, 24 p. 7-11, 1998.

BELL, C. R. *et al.* Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 46-53, 1995.

BERNARDI, W. F. *et al.* Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios de cultura com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 503-506. Dez. 2004

BERRAQUEIRO, F.R. *et al.* Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Farmacéutica**, Granada, v.17, p.399-406,1976.

BORGES, A. L. Calagem e Adubação. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.) **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 32-44

BORGES, A. L. OLIVEIRA, A. M. G. Nutrição, Calagem e Adubação. CORDEIRO, Z. J. M. **Banana produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia, 2000, p. 47-59.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. (Ed.) **O cultivo da Bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279 p.

BOTTINI, R. *et al.* Identification of Gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 45-47, 1989.

BROWN, A. E.; HAMILTON, J. T. G. Indole-3-ethanol produced by *Zygorhynchus moelleri*, and indole-3-acetic acid analogue with antifungal activity. **Mycological Research**, Manchester, v. 96, n. 1, p. 71-74, 1992.

BUCHANAN, B. B.; *et al.* **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiology, 2000. 1.367 p.

CASSÁN, F. *et al.* *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolize conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. **Plant Physiology**, Rockville v. 125, p. 2053-2058, 2001.

CASSAN, F. *et al.* *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, [s.l.], v.45, p. 28-35, 2009.

CAVALCANTE, J. J. V. *et al.* Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 58, n. 3, p. 673-686. Jan. 2007

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p. 23-31, 1988.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

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

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHANG, Y. H. *et al.* *Sporolactobacillus vineae* sp. nov., a spore-forming lactic acid bacterium isolated from vineyard soil. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, n. 10, p. 2316-2320, 2008.

COMPANT, S. *et al.* Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, [s.l.], v. 30, p. 669-678, 2010.

CORDEIRO, Z. J. M.; MOREIRA, R. S. A Bananicultura brasileira. In: XVII Reunião Internacional Acorbat 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: v. 1, p. 36-47, 2006.

COSTA, L. E. O. **Diversidade genética, antagonismo microbiano e produção de fitases por bactérias endofíticas de folhas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)**. 2010. 98 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

CROZIER, A. *et al.* Analysis of indole-3-acetic and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 11, p. 2833-2837, 1988.

CRUZ, L. M. *et al.* 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphates by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1451-1458, 1992.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. dos S. Classificação botânica, origem e evolução. In: **Banana para exportação**: Aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. p. 9-13. (FRUPEX, Série Publicações Técnicas, 18).

DEUBEL, A. *et al.* Transformation of organic rhizodeposits by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, [s.l.], v. 163, p. 387-392, 2000.

DIDONET, A. D.; MARTIN-DIDONET, C. G.; GOMES, G. F. **Avaliação de linhagens de arroz de terras altas inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A. brasilense* Sp 245**. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA – CNPAF, 2003. 4 p. (EMBRAPA – CNPAF. Comunicado Técnico, 69).

DOBBELAERE, S.; VANDELEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, p. 107-149, 2003.

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

ELBELTAGY, A. *et al.* Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, [s.l.], v. 46, p. 617-629, 2000.

FAGAN, E. B. *et al.* Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FAO. Food and Agricultural Organization. **Banana.** Disponível em: <www.unctad.org/infocomm/.../banana/market.htm>. Acesso em: 05 Nov. 2011

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

FIOVARANÇO, J. C. Mercado Mundial da Banana: Produção, comércio e participação brasileira. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 33, n. 10, out.2003.

FUENTES-RAMIREZ, L. E. *et al.* *Acetobacterdiazotrophicus*, an indolacetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p. 145-150, 1993.

FUJITA, R. *et al.* *Sporolactobacillus putidussp. nov.* an endospore-forming lactic acid bacterium isolated from spoiled orange juice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 7, p. 1499-1503, 2010.

FURTINI NETO, A. E. *et al.* **Fertilidade do Solo.** Lavras: ESAL/FAEPE, 2001. 252 p.

GANGULY, T.K., JANA, A.K., MOITRA, D.N. An evaluation of agronomic potential of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus megaterium* in fibre-legume-cereal system in an Aeric haplaquept. **Indian Journal of Agricultural Research**, New Delhi, v. 33, p. 35-39, 1999.

GERMAINE, K. *et al.* Colonization of popular trees by *gfp* expression bacterial endophytes. **Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 109-118, Apr. 2004.

GERRETSEN, F.C. The influence of microorganisms on thephosphate intake by the plant. **Plant and Soil**, Crawley, v. 1, p. 51-81, 1948.

GOLDSTEIN, A. H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. **Biological Agriculture and Horticulture**, New Jersey, n. 12, p. 185-193, 1995.

GOMES, J. A. **Absorção de nutrientes pela bananeira cv. Prata (Musa AAB, Subgrupo Prata) em diferentes estádios de desenvolvimento**. 1988, 98 p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

GYANESHWAR, P. *et al.* Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Crawley, v. 245, p. 83-93, 2002.

HAHN, K.; STRITTMATTER, H. K. Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione-s-transferase. **European Journal of Biochemistry**, Rockville, v. 226, p. 619-626, 1994.

HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effuses* L. **Cambridge Journal of Microbiology**, Cambridge, v. 49, p. 781-787, 2003.

HAN, S. O.; NEW, P. B. Variation in Nitrogen Fixation Ability among Natural Isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 36, p. 193-201, 1998.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – **Sistema IBGE de Recuperação Automática**: SIDRA. Brasília: IBGE, 2011. <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agri/default.asp>> Acesso em 05 de set. 2011.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays*)**

L.). 2010. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

INUI, R. N. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar.** 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

JADOSKI, S. O.; *et al.* Características da lixiviação de nitrato em áreas de agricultura intensiva. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava-PR, v. 3, n. 1, p. 193-200, 2010.

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

KHAN, A. A. *et al.* Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. **Journal of Agricultural and Biological Sciences**, [s.l.], n. 1, v. 1, p. 48-58, 2009.

KITAHARA, K.; SUZUKI, I. *Sporolactobacillus* nov. subgen. **Journal of General and Applied Microbiology**, Malden, v. 9, n. 1, p. 59-71, 1963.

KUCEY, R. M. N. Effects of *Penicillium bilagi* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 68, p. 261-270, 1988.

KUSS, A. V. *et al.* Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, out. 2007.

LACEY, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Do you have a future? **Biological Control**, [s.l.], v. 21, p. 230-248, 2001.

LEE, S. *et al.* Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 16, p. 5384-5391, 2004.

LINDERMANN, W. C.; GLOVER, C. R. Nitrogen fixation by legumes. **Cooperative Extension Service – College of Agriculture and home Economics**. Guide A-129, may, 4 p, 2003.

LIU, S. T. *et al.* Cloning of a *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the co-enzyme pyrroloquinoline quinone. **Journal of Bacteriology**, Washington, n. 174, p. 5814-5819, 1992.

LODEWYCKX, C. *et al.* Endophytic Bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOIRET, F. G. *et al.* Inoculation of sugarcane with *Pantaea* sp. Increases amino acid contents in shoot tissues, serine, alanine, glutamine, and asparagine permit concomitantly ammonium excretion and nitrogenase activity of the bacterium. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1152-1161. 2009

LUO, S. *et al.* Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promotion endophyte *Bacillus* sp. SLS18. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 93, p. 1745-1753, p. 2012.

LUVIZOTTO, D. M. **Caracterização Fisiológica e Molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar.** 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.21, p.1057–1062, 2005.

MANTELIN, S.; TOURAINE, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: Impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. e interação com *Xylella fastidiosa***. 2002.150p. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARTINEZ, L. *et al.* Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant and Soil**, Crawley, n. 257, p. 35-47, 2003.

MATTHIESEN, M. L.; BOTEON, M. **Análises dos principais pólos produtores de banana no Brasil**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ, 2003. 18 p. Disponível em <<http://cepea.esalq.usp.br/pdf/banana.pdf>>. Acesso em: 26 maio 2007.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Crawley, v.173, p.337-342, 1995.

MESQUISA FILHO, M. V.; TORRENT, J. Phosphate-sorption as related to mineralogy of a hydrosequence of soil from the Cerrado region (Brazil). **Geoderma**, Amsterdam, v. 58, p. 107-123, 1993.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 808-811, 1990.

MOREIRA, D. C. A.; REBELLO, R. V. Bananicultura no Norte de Minas Gerais em 2008. In: SIMPOSIO NORTE MINEIRO SOBRE A CULTURA DA BANANA, 2., 2008, Nova Porteirinha. **Anais...** Belo Horizonte: Epamig, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica do nitrogênio. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA/DCS, 2006. p. 501-529.

MURTY, M.G., LADHA, J.K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and Soil**, Crawley, v. 108, p. 281–285, 1988.

MUTHUKUMARASAMY, R.; *et al.* *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

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

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap. 1, p. 15-60.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 23, p.6-8, 2005.

OLIVEIRA, A. L. M. *et al.* The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Crawley, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, S. S. *et al.*. **A Cultura da banana**: Aspectos técnicos, sócio-econômicos e agroindustriais. EMBRAPA, Brasília, DF, 1999. p. 85-105.

PERIN, L. *et al.* Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 47-53, 2003.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A. *et al.* Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, n. 75, p. 1143–1150, 2007.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: Molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, [s.l.], v.26, p.186–199, 2003.

PHETCHARAT, P.; DUANGPAENG, A. Screening of endophytic bacteria from organic rice tissue for indole acetic acid production. **Procedia Engineering**, [s.l.], v. 32, p. 177-183, 2012.

PILLAY, V. K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature and genotype effectson *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.354- 361, 1997.

PLOETZ, R. C. *et al.* **Banana and plantain** – an overview with emphasis on Pacific islands cultivars. Hōlualoa: Permanent Agriculture Resources, 2007. 27 p.

PRICE, N. S. Banana morphology – Part I: Roots and rizhomes. In: GOWEN, S. (Ed.). **Bananas and plantains**. London: Chapman & Hall, 1995. P. 179-189.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: localization and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology and Biochemistry**, Ottawa, v. 43, p. 254-259, 1997.

RAVEN, P. H. *et al.* **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. 906 p.

REGHUVARAN, A. *et al.* Isolation and characterization of nitrogen fixing bacteria from raw coir pith. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 27, p. 7063-7071, 2012.

REIS JUNIOR, F. B. *et al.* Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de

cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa-MG, V. 28, p. 103-113. 2004.

REITER, B. *et al.*. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.9, p. 549-555, 2003.

ROBINSON, J. C. **Bananas and plantains**. 2 ed. Cambridge: University Press, 1996. 238 p.

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

RODRIGUEZ, H.; GONZALES, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 84, p. 155-161, 2000.

ROESCH, L. F. W. *et al.* Screening of diazotrophic bacteria *Azopirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, n. 23, p. 1377-1383, 2007.

ROMERO, J. O.; ZAMORA, O. P. Tensión de humedad del suelo y fertilización nitrogenada en plátano (Musa AAA Simmonds) cv. Gran Enano. **Agrociência**, Curitiba, v. 40, n. 02, p. 149-162, 2006.

ROOS, W.; LUCKNER, M. Relationship between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 130, p. 1007-1014, 1984.

ROSADO, A. S. *et al.* A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O. *et al.* **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 429-448.

SANTOS, I. B. *et al.* Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, Suplemento 1, p. 142-149, mar. 2012.

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; THAGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, Haiden, v. 66, p. 1794-1798. 2007.

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

SHAHAB, S.; AHMED, N.; KHAN, N. S. Indol acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. **African Journal of Agricultural Research**, [s.l.], v.4, n 1 p. 1312-1316. Nov. 2009

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonista a fitopatógenos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 69, p. 167-179, 1999.

SILVA FILHO, G.N., VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, v.24, p.311- 319, 2000.

SILVA, A. C. S. *et al.* Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato nas raízes de importância econômica em Manaus e Rio Preto da Eva, Amazonas. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Tocantins, v. 2, n. 1, p. 37-42, 2011.

SILVA, J. T. A.; BORGES, A. L.; MALBURG, J. L. Solos, adubação e nutrição da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 20. p. 21-36. 1999

SIMMONDS, N. W. **Los plátanos**. Barcelona: Blume, 1973. 539 p.

SIQUEIRA, J. O. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: UFLA/DCS, 1999. 818 P.9

SOBRAL, J. K. *et al.* Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

SOBRAL, J. K.. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (Glycine max) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003.174f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' / USP, Piracicaba, 2003.

SOUCHIE, E. L. *et al.* Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.

SOUZA, C. A. **Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas**. 2010. 38 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SOUZA, S. A. **Diversidade de bactérias endofíticas em bananeira “Prata-Anã”**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, Reading, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. **Cycles of Soil:** Carbon, nitrogen, phosphorus, Sulfur, Micronutrients. New York: Wiley and Sons, 2005. 380 p.

STOLTZFUS, J. R. *et al.*. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, Crawley, v.194, p.25-36, 1997.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Bananas**. 3 ed. Essex: Longman, 1987, 534 p.

SY, A. *et al.* Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, p. 214-220, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TAURIAN, T. *et al.* Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, Crawley, v. 329, p. 421-431, 2010.

TEIXEIRA, K. R. S. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 26 p. (EMBRAPA-CNPAB, Documentos, 32).

TEIXEIRA, M. A. *et al.* Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 43-49, jan. 2007.

THAZIN, N. A. *et al.* Isolation of endophytic bacteria from green gram and study on their plant growth promoting activities. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 525-537, 2011

TSAVKELOVA, E. A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Heidelberg, v. 42, n. 2, p. 117-126, 2006.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 61, p. 435-440, 2003.

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

VERMA, S. C. *et al.* Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 91, p. 127-141, 2001.

WEBER, O. B. *et al.* Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Crawley, v. 210, p. 103-113, 1999.

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

YADAV, K., SINGH, T. Effect of *Bacillus megatherium* on the solubilization of phosphatic fertilizers influencing yield and uptake by sugarcane. **Bharatiya Sugar**, Pune, v.15, p.15-23, 1990.

YANG, L. *et al.* *Lysinibacillus mangiferahumi* sp. nov., a new bacterium producing nematicidal volatiles. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 102, p. 53-59, 2012.

ZAPATA, F. AMANN, H. ³²P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. **Fertilizer Research**, [s.l.], v.41, p. 189-195, 1995.

ZILLI, J. E. *et al.* Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, p. 391-411, 2003.

ZINNIEL, D. K. *et al.* Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Nebraska, v.69, p.2198-2208, 2002.