UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ROMÁRIO CRISOSTOMO DE OLIVEIRA

Ocorrência, isolamento e caracterização de *Azospirillum* sp. em *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze (Jaracatiá)

Campo Grande–MS
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ROMÁRIO CRISOSTOMO DE OLIVEIRA

Ocorrência, isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas de *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze (Jaracatiá)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Linha de pesquisa: Ecologia, conservação e uso dos recursos vegetais

Orientadora/Instituição: Profa. Dra. Gecele Matos Paggi/UFMS/CPAN
Coorientadora/Instituição: Profa. Dra. Marivaine da Silva Brasil/CPAN

Campo Grande–MS
Julho-2019

Dedico este trabalho à minha Mãe, Evair Crisostomo de Oliveira. Você é o motivo de tudo isso. Minha força, meu amor e minha luz!!! Que bom que o seu amor me escolheu. Te amo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos em minha vida. Por guiar e iluminar o meu caminho até aqui, por ter me dado forças, saúde e sabedoria.

À minha Mãe, Evair Crisostomo de Oliveira, pelo amor incondicional, pela proteção, pela companhia nos momentos desesperadores, por ser sempre a minha força. Não tenho palavras para agradecer todo o seu esforço para me ver chegar aonde cheguei. Devo tudo isso a você. Eu te amo.

À minha irmã, Rita Cristina, por estar sempre na torcida, por ter me tranquilizado e cuidado muito bem da nossa Mãe enquanto estive ausente. Te amo muito!!!

Ao meu Pai, Edirson Ortiz, por ser o meu porto seguro e apoiar as minhas loucuras, você é o melhor pai do mundo. Te amo.

À minha segunda Mãe e Madrinha, Eliane Canavarro dos Santos, por acreditar no meu sonho, por ter me ajudado financeiramente quando mais precisei, por não ter deixado eu desistir, por ser sempre o meu "SIM".

À Professora Dra. Iria Hiromi Ishii por ter me incentivado desde a ideia do projeto. O meu muito obrigado por tudo: pelas palavras de apoio e carinho. Obrigado por acreditar em mim. "Ganbatta"!!!

À minha orientadora Professora Dra. Marivaine da Silva Brasil, minha "Mãe" da Microbiologia. Agradeço por ter me apresentado a esse universo desde a graduação e pelos conhecimentos compartilhados, apoio, "puxões-de-orelha" e, principalmente, paciência. Saiba que te admiro muito. A você minha imensa gratidão.

À minha orientadora Professora Dra. Gecele Matos Paggi, pela orientação, pela cumplicidade, apoio incondicional, sobretudo emocional. Por ser uma profissional incrível e uma pessoa formidável. Super Obrigado!!! Quando eu crescer quero ser que nem você.

Ao Marquito, Anielly, Zen, Lucas Welligton, Alessandra e Tainan Roberto pela grande ajuda nos trabalhos de campo, eu não teria chegado até aqui não fosse por vocês. Obrigado pela cumplicidade, pela prontidão, pelos momentos incríveis que passamos juntos. Vocês

são incríveis e ficarão marcados em meu coração sempre. Valeu “Equipe Romer”!!! Rsrsrs.

À Nina (Valdineide Maria), minha “fiel escudeira” rsrs. Eu não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim. Obrigado por me acompanhar em todos os procedimentos, pelas madrugadas que ficamos até tarde no laboratório, pelas caronas, almoços, sobremesas e muitos outros mimos, que com certeza ficarão sempre guardados em meu coração. Eu não teria conseguido sem você!!! Te amo.

À Professora Dra. Lucí Helena Zanata, pelas palavras de incentivo e conforto. Por me fazer enxergar o melhor lado dos momentos ruins e aproveitar as oportunidades. Deixo registrado o meu amor pela sua pessoa e admiração pela profissional que és. Incrível.

À minha irmã da vida, Me. Adriana Maria Fernando Espinóza (Todricka), que foi minha família (e continua sendo) no tempo em que cursamos as disciplinas do mestrado. Não tenho palavras para descrever o quão importante você é para mim. Obrigado por enxugar as minhas lágrimas nos momentos difíceis, por acreditar em mim, por me aturar, por bagunçar e como toda boa irmã puxar minha orelha. Que pena que passou tão rápido, mas foi vivido intensamente. Foi a aventura mais incrível da minha vida.

Às minhas melhores amigas Anna Beatriz Dantas Martins, Larissa Hândrea Machado. Quero que saibam que eu amo vocês incondicionalmente, obrigado por serem mais que amigas. Minhas irmãs. Por me apoiarem desde os bastidores, por estarem comigo nos momentos felizes e, principalmente, nos momentos difíceis. Que sejamos sempre a nossa força e que estejamos sempre “Juntos e Shallow now!!!”

À minha amiga Me. Mayara Santana Zanella, obrigado pelo apoio, incentivo e cumplicidade. Saiba que mesmo longe, terás o meu carinho, apoio, reconhecimento e amizade.

Ao meu grande amigo Me. Thomáz Guerreiro, pelas inúmeras viagens, pelos momentos de distração, estudos na madrugada. Não poderia passar os melhores sufocos sem você rsrs. Super obrigado de verdade!!!

À Suzelaine Maria (Suzy Mary), você não tem ideia do quanto sou feliz por ter te conhecido e aprendido muito com você. Só nós sabemos das dificuldades que passamos,

mas em todos esses momentos nunca nos faltou esperança e fé. Sua luz é incrível. Gratidão.

Aos meus amigos da República "A arca" por me receberem tão bem durante o momento em que estive aí, em especial à Aliciane Rodrigues (Alisha) minha irmãzona. Obrigado pelos melhores conselhos, por sempre me animar e incentivar. Que bom que a gente tem a gente. Espero retornar e aproveitar mais o tempo com vocês.

Aos meus amigos e Professores do curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal da UFMS, saibam que eu tenho enorme admiração por vocês e aprendi muito com cada um de vocês, amei os momentos que passamos juntos. Nunca me esquecerei da experiência e conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos e técnicos dos Laboratórios de Ecologia, Botânica, Zoologia, Microbiologia, Genética e Geoprocessamento da UFMS- *Campus* do Pantanal, pela companhia diária, em especial à Juliany, Augusto, Luana, Laís de Sá, Stella, Kevin, Lennon, Brenda, Ana Lorena, Adrielly, Prof.ª Dra. Luciana Escalante, Me. Fernanda Maria de Russo Godoy, Dra. Nayara Fernanda, Me. Fernanda Motta, Emílio Flores, Daniel, Glauter, Damião, Fernando Lara e Me. Roxana Castro, pelo convívio diário, pelos vários almoços, trocas de experiências, aprendizado, carinho e café... "Nobody said it was easy, but"... Completem!!!

Aos meus amigos de vida, Thiago Nunes, Vyctor Ferreira, Héverton Gaete, Júnior Santos, Vinícius, Cleiton e Marcelo Samaniego. Vocês são os melhores amigos-irmãos que alguém como eu poderia ter. Obrigado pela torcida de sempre e "Vamos que vamos!!!" rsrs.

Aos meus amigos e companheiros de todas as horas: Wener Hugo, Rogério Provenzano, Antonio, Eder, Anny, Raissa Radiche e Jaíza Motta. Por toda energia positiva, por me lembrarem que nunca estive e nunca estarei sozinho, que eu posso contar sempre com vocês.

À minha Família e demais amigos (que eu possa ter esquecido de citar, me perdoem rsrs) que sempre estiveram comigo compartilhando boas vibrações e também angústias, não fosse o apoio de vocês, o processo até aqui seria árduo.

À Fundect pela concessão da bolsa.

À banca examinadora pelas sugestões e contribuições a este trabalho.

Enfim, a todos que estiveram na torcida direta e indiretamente. AMO VOCÊS!!! GRATIDÃO resume tudo isso.

SUMÁRIO

1. Introdução geral 14
1.1 Família botânica Caricaceae 14
1.2 *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze 15
1.3 Relação planta-bactéria 17
1.4 Caracterização de bactérias com potencial para promoção de crescimento de plantas 20
2. Objetivos 23
2. 1 Objetivo Geral 23
2.2 Objetivos Específicos 23
3. Referências Bibliográficas 24
4. ARTIGO 31
4.1 Abstract 33
4.2 Introdução 34
4.3 Material e Métodos 36
4.3.1 Amostragens das plantas e áreas de estudo 36
4.3.2 Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas 38
4.3.3 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos 39
I. Caracterização morfológica 39
II. Verificação e quantificação da produção de ácido-indolacético (AIA) 39
III. Solubilização de fosfato de alumínio 41
IV. Solubilização de fosfato de cálcio 41
4.3.4 Caracterização bioquímica dos isolados 42
I. Determinação da atividade fosfatase dos isolados 42
II. Determinação da atividade amilolítica dos isolados 43
4.3.5 Análise da variabilidade genética das cepas isoladas 43
4.3.6 Análises dos dados 44
4.4 Resultados 45
4.4.1 Ocorrência, contagem e isolamento de bactérias diazotróficas 45
4.4.2 Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados bacterianos 48
4.4.3 Análise da variabilidade bacteriana por meio de BOX-PCR 57
4.5 Discussão 60
4.5.1 Ocorrência, contagem e isolamento de bactérias diazotróficas 60
4.5.2 Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados 61
4.5.3 Análise da variabilidade genética por meio de BOX PCR 68
4.6 Referências bibliográficas 69
5. Considerações finais 80

ANEXOS 81

Resumo

A capacidade de fixação biológica do nitrogênio atmosférico por bactérias diazotróficas impulsiona os estudos de ocorrência, isolamento, caracterização e até mesmo seleção de estirpes eficientes em promover o crescimento vegetal. Porém, no Brasil, poucos estudos têm destacado a interação entre bactérias e plantas nativas, principalmente frutíferas. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi registrar a ocorrência, isolar e caracterizar bactérias do gênero *Azospirillum* associadas à *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze, bem como verificar a habilidade dos isolados bacterianos quanto a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal. Para isto, foram coletados amostras de folhas, raízes e solo rizosférico de três indivíduos da espécie vegetal de duas áreas: Assentamento Taquaral e Assentamento Jacadigo, localizadas à cerca de 15 km da cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul. A verificação da ocorrência e isolamento das bactérias das partes amostradas de cada planta foram realizados por meio da técnica do Número Mais Provável utilizando os meios de cultura semissólidos NFB e LGI (isentos de nitrogênio) semi-seletivos para os gêneros *Azospirillum* sp. e *Nitroaspirillum* sp. (anteriormente *Azospirillum amazonense*). A contagem foi realizada com base na presença de película (em forma de véu), seguindo a Tabela de McCrady para três repetições por diluição. Após o crescimento positivo os frascos das maiores diluições foram repicados sucessivamente para meios semissólidos e sólidos semi-específicos (NFb/LGI) para confirmar o caráter diazotrófico. A caracterização morfológica dos isolados foi feita em meio sólido Batata, no qual a morfologia das colônias foi avaliada visualmente. As características geradas para cada isolado bacteriano foram comparadas e as suas semelhanças estimadas pelo Índice de Jaccard obtidos pelo algoritmo UPGMA. Foram isoladas 147 bactérias, das quais 50 apresentaram perfil diazotrófico. Estas foram selecionadas para avaliação das características funcionais relacionadas a produção de substâncias promotoras de

crescimento vegetal, como solubilização de fosfatos de alumínio e cálcio, atividades amilolítica, fosfatases ácida e alcalina, e produção de Ácido indolacético. Além disso a variabilidade genética destes isolados foi analisada pela técnica do Box A1R-PCR e os perfis dos amplicons gerados de cada isolado foram agrupados pelo método UPGMA. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no Número Mais Provável de bactérias diazotróficas entre as áreas de estudo. Os isolados apresentaram alta variabilidade fenotípica e genotípica, sendo observada a formação de sete grupos a 70% e 77% de similaridade. O meio de cultivo com maior representatividade foi o NFb, sugerindo que os isolados bacterianos obtidos nesse estudo pertencem ao gênero *Azospirillum*. Do total, 36% dos isolados produziu AIA, 16% solubilizou fosfato de cálcio, 24% apresentou atividade fosfatase ácida, 22% apresentou atividade fosfatase alcalina e 66% apresentou atividade amilolítica, sugerindo que estes isolados apresentam potencial para promoção de crescimento. Assim, é o primeiro estudo de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas à *J. corumbensis* para o Estado de Mato Grosso do Sul.

Palavras-chave: Box A1R-PCR, diazotróficas, FBN, jaracatiá

Abstract

The capacity for biological nitrogenfixation by diazotrophic bacteria rises the studies of occurrence, isolation, characterization and selection of new strains efficient in plant growth promotion. However, in Brazil, few studies have focus on the interactions between bacteria community and native plant species, specifically fruit plants. Therefore, the aim of this study was to record the occurrence, to isolate and to characterize *Azospirillum* bacteria from *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze, as well as, to verify the ability of the bacteria strains regarding the production of substances related to plant growth promotion. For this, leaves, roots, and rhizospheric soil samples of the plant species were collected from two areas (three individuals each): Settlement Taquaral and Settlement Jacadigo, located around 15 km far from Corumbá city, Mato Grosso do Sul state. To verify and isolate bacteria from each sampled part of the plant, we performed the Most Probable Number (MPN) approach, using the semisolid culture mediums NFB and LGI (nitrogen-free), which are semi-selective for the genera *Azospirillum* sp. and *Nitroaspirillum* sp. (previously *Azospirillum amazonense*). The counting was conducted considering the presence of a pellicle, following McCrady table for three repetitions per dilution. After positive growth, the flakes of bigger dilutions were transferred to semi-solid and solid media (NFb/LGI) in order to confirm the diazotrophic character. The morphological characterization of bacteria strains was performed by growing colonies in Potato solid medium, and analyzing them visually. Morphological characters of each bacteria strain were compared and their similarities were estimated by Jaccard index using the UPGMA software. We isolated 147 bacteria, from that, 50 presented a diazotrophic profile. Those 50 bacteria were then used to evaluate functional feature related to the production of certain substances involved in plant growth promotion, such as aluminum and calcium phosphate solubilization, amylolytic and acid and alkaline phosphatase

activities, and indolacetic acid (IAA) production. Besides, the strains genetic variability was analyzed using the Box A1R-PCR technic; the profiles obtained from each strain were grouped using UPGMA method. The Most Probable Number (MPN) was not significantly different between the two studied areas. The bacteria strains presented high phenotypic and genotypic variation, forming seven groups with around 70% and 77% of similarity. Most bacteria strains were obtained from NFb medium, suggesting that they may belong to *Azospirillum* genus. From the 50 bacteria strains, 36% produced IAA, 16% solubilized calcium phosphate, 24% presented acid phosphatase activity, 22% presented alkaline phosphatase activity, and 66% presented amylolytic activity, suggesting that these strains presented potential for plant growth promotion. Thereby, this is the first study regarding *Azospirillum* diazotrophic bacteria associated with *J. corumbensis* in the Mato Grosso do Sul state.

Keywords: Box A1R-PCR, diazotrophic, “jaracatiá”, NFB

1. Introdução geral

1.1 Família botânica Caricaceae

A família botânica Caricaceae compreende 35 espécies distribuídas em seis gêneros: *Cylicomorpha* (que abrange espécies com distribuição restrita às florestas úmidas na África Ocidental e Oriental), *Jarilla* e *Horovitzia* (que abrangem espécies restritas à América Central), *Jacaratia*, *Vasconcellea* e *Carica* (que abrangem espécies predominantes da América do Sul e América Central). As formas de crescimento dessas plantas variam de ervas rizomatosas a árvores altas, a maioria das espécies é dióica (Carvalho e Renner 2014).

A importância econômica da família Caricaceae está relacionada à grande produção de frutos pela sua principal espécie, *Carica papaya*, que tem amplo cultivo nos trópicos (Damasceno Júnior et al. 2015). Essa cultura pode ser propagada por sementes, estaquia e enxertia. No entanto, a propagação por sementes é o método mais utilizado para cultivo comercial (Oliveira e Trindade 2000). No Brasil, *Carica papaya* corresponde à espécie de frutífera mais cultivada, com uma colheita em torno de 1,5 milhões de toneladas de frutos por ano, representando cerca de 12,5% da produção mundial. Deste modo, o país ocupa a segunda posição no *ranking* mundial de produção de mamoeiro (Fao 2016).

A espécie *Carica papaya* é singular em vários aspectos: possui hábito de crescimento perene de vida curta, folhas grandes palmatilobadas, crescimento rápido, caule central ou ramificado terminalmente, e alta plasticidade fenotípica na parte aérea, raízes e órgãos reprodutivos. Mesmo consideradas como plantas de sol, estas exibem alta plasticidade à sombra como mudanças na massa foliar, relação clorofila a/b e densidade estomática (Jiménez et al. 2014). Mudas e plantas adultas de mamão também são sensíveis aos estímulos mecânicos e mostram fortes respostas tigmomorfogenéticas

(resposta das plantas à sensação mecânica, alterando seus padrões de crescimento) (Porter et al. 2009). Além disso, pode ter três formas sexuais possíveis: feminina, masculina e hermafrodita. As alterações nas formas sexuais e na estrutura das flores têm sido relacionadas a restrições ambientais, que consequentemente modificam a produção e a morfologia dos frutos (Jiménez et al. 2014).

Dentre os demais gêneros de Caricaceae, destaca-se o gênero *Jacaratia*, com sete espécies (*J. spinosa, J. digitata, J. chocoensis, J. dolichaula, J. mexicana, J. heptaphylla* e *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze) difundidas nas planícies dos neotrópicos (Carvalho e Renner 2014). No Brasil, são encontradas quatro destas espécies: *J. heptaphylla, J. spinosa, J. digitata* e *J. corumbensis* O. Kuntze (Lleras 2015, Giulietti et al. 2018), sendo esta última, objeto desse estudo.

1.2 *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze

Jacaratia corumbensis O. Kuntze (Figura 1) é considerado um mamão (Kinupp 2007), conhecido também como "Yaca ra ti a", que em Tupi-Guarani significa "indivíduo de fruto cheiroso", uma planta arbustiva que varia de 1 a 10 metros de altura cuja copa chega a 3,5 metros (Pott e Pott 1994). Foi coletado pela primeira vez em 1892 pelo botânico Carl Ernest Otto Kuntze na cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul, e recebe também o nome popular de mamãozinho de veado, pois em período de frutificação os veados se alimentam desses frutos (Cavalcanti 2004). Pode ocorrer em diferentes formações florestais, como nas regiões semiáridas do Nordeste (Cavalcanti 2009), Tocantins, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (Aguiar et al. 2012, Hassler 2019). Ocorre também em países como Argentina, Bolívia e Paraguai (Hassler 2019). A floração e frutificação desta planta são abundantes nos meses de agosto a dezembro (Lima 1984).

Na literatura há descrições importantes de *J. corumbensis* como planta pioneira, por apresentar crescimento rápido e desempenho similar às outras espécies de plantas pioneiras quando utilizadas para regeneração de áreas degradadas (Moraes et al. 2006). As plantas pioneiras são conhecidas por sua capacidade de ocupar áreas recém-perturbadas, onde as condições ambientais favorecem a sua germinação (Martínez-Ramos 1985).

Além disso, as plantas de *J. corumbensis* são utilizadas por produtores agroecológicos, ou mesmo agricultores familiares e comunidades tradicionais, como alimento (Leff 2002). Também são consideradas como plantas de aproveitamento total, já que se pode utilizar o indivíduo completamente: fruto, caule e raiz (Moraes et al. 2006) (Figuras 1A e 1B). Na caatinga (Nordeste do Brasil) o sistema subterrâneo dessa espécie (xilopódio; Figura 1C), que apresenta 30% de proteína bruta, é utilizado na suplementação alimentar do gado e, em Mato Grosso do Sul, da raiz ralada, a população local prepara doce e rapadura, semelhante ao produzido do caule do mamão comum (Damasceno Júnior e Souza 2010).

Figura 1. *Jacaratia corumbensis*. Frutos (A); Folhas e flor (B) e Xilopódio (C). Fotos: TSG Botelho.

Atualmente, *J. corumbensis* encontra-se restrita a fazendas tradicionais ou, a viveiros, onde essa planta nativa está preservada. Um dos fatores da ocorrência restrita dessa espécie é a perda de habitats por fragmentação florestal que vem ocorrendo nas

últimas décadas. Consequentemente, atualmente a espécie é encontrada em áreas muito menores em relação às áreas originais (Aguiar et al. 2012).

Outros fatores também contribuem para a perda da biodiversidade em ecossistemas nativos, como o uso incorreto das técnicas de manejo do solo e de plantas (Fachinello et al. 2008), bem como a utilização de fertilizantes agrícolas que causam danos como eutrofização do solo, contaminação do lençol freático e aumento do efeito estufa (Carvalho e Zabot 2012). Para evitar esses problemas, buscam-se práticas agrícolas sustentáveis que visem conciliar a alta produtividade e conservação ambiental com baixo custo. Neste contexto, a interação entre micro-organismos do solo e plantas recebe atenção devido a relação benéfica que estabelecem (Bashan et al. 2014), com destaque para a utilização de micro-organismos em pesquisas sobre insumos biológicos aplicados ao crescimento vegetal, para substituição pelo menos parcial dos fertilizantes nitrogenados (Compant et al. 2010, Glick 2012, Rodrigues 2016a).

1.3 Relação planta-bactéria

A interação entre plantas e micro-organismos ocorre há milhões de anos, desde a evolução das plantas nos mais variados ecossistemas terrestres (Gaiero et al. 2013). Um grupo de bactérias capazes de propiciar melhorias na adaptação de plantas tem sido estudado por apresentar uma variedade de mecanismos individuais ou combinados que são utilizados para proteção e crescimento de plantas. Dentre esses mecanismos podemos citar a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, produção de sideróforos, indução de resistência sistêmica, solubilização de fosfatos inorgânicos, controle biológico de fitopatógenos e tolerância contra estresses bióticos e abióticos (Moreira et al. 2010, Hungria et al. 2010, Bashan et al. 2014). Assim, esses micro-organismos são denominados como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) (Fukami et

al. 2018), que podem colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas (Kaschuck e Hungria 2017). Portanto, a perda destes micro-organismos pode alterar a estrutura populacional de outros organismos ao longo da cadeia trófica e até mesmo causar impactos sobre os processos vitais do solo, como a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, tornando o sistema agrícola dependente do uso de fertilizantes (Moreira et al. 2010).

Na literatura há descrições de gêneros de BPCPs associadas a plantas de interesse agrícola. Dentre estes, podemos citar: *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp. e *Bradirhizobium* sp. (Moreira et al. 2010), os quais foram isolados de plantas de milho (Hungria 2011), cana-de-açúcar (Beneduzi et al. 2013), leguminosas e frutíferas como coco (Fernandes et al. 2001), banana (Mia et al. 2010), abacaxi e mamão (Rodrigues 2016a), assim como de plantas nativas como arroz selvagem (Fernandes-Júnior et al. 2013), bromélias (Viana 2016) e gramíneas forrageiras (Souza et al. 2017). No entanto, apesar de muitos estudos relatarem a eficiência de bactérias promotoras de crescimento em plantas leguminosas e em gramíneas, a interação destas com plantas nativas, principalmente frutíferas, ainda é pouco explorada.

Nos últimos anos houve um crescimento no interesse por estudos com BPCPs, devido às vantagens econômicas e importância ambiental que representam e que tornam este cenário bastante promissor para o desenvolvimento de novas formulações de inoculantes à base de micro-organismos com potencial biotecnológico para a agricultura (Kaschuck e Hungria 2017).

Entre as bactérias promotoras de crescimento vegetal, as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (denominadas diazotróficas) são as mais estudadas e, dentre elas, destacam-se diferentes espécies de *Azospirillum* sp. Este gênero foi descrito por

Beijerinck (1925**)** como *Spirillum lipoferum* e posteriormente reclassificado como *Azospirillum* (Tarrand 1978). Bactérias desse gênero pertencem à classe das α-Proteobactérias, são gram-negativas de vida livre, microaerofílicas e suas células apresentam formato de víbrio ou espirilo, com único flagelo polar bem desenvolvido e vários flagelos laterais de alta motilidade quando crescidos em meios de cultivo semissólido e líquido (Moreira et al. 2010, Rosenberg et al. 2014). Além disso, esses micro-organismos são considerados endofíticos facultativos por colonizarem raízes e/ou o interior de tecidos vegetais, mas podem sobreviver no solo e colonizar a rizosfera de plantas (Hungria 2011).

Até o momento, na literatura, 20 espécies de *Azospirillum* sp. já foram descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largomobile*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zeae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. humicireducens*, *A. fermentarium*, *A. soli* e *A. agricola* (DSMZ 2018). No entanto, as espécies mais estudadas em termos de fisiologia, genética e distribuição geográfica foram *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (Fibach-Paldi et al. 2012**).** Esses micro-organismos apresentam benefícios que vão além da fixação biológica de nitrogênio, como a produção de fitormônios (que induzem o crescimento de raízes e melhoram a absorção de água e nutrientes pelas plantas), solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, controle de fitopatógenos, tolerância sistêmica induzida, bem como resistência a estresses bióticos e abióticos (Fukami et al. 2018). Assim, apresentam notável capacidade de beneficiar uma variedade de espécies vegetais (Bashan e de-Bashan 2010, Hungria et al. 2010, Hungria 2011, Fukami et al. 2016).

Pereg et al. (2016) descrevem que 35 famílias botânicas obtiveram benefícios exercidos por esses micro-organismos, com destaque para 17 delas: Amaranthaceae,

Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Caryophyllaceae, Chlorophyceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Piperaceae, Poaceae, Rosaceae, Solanaceae e Urticaceae, o que torna evidente que bactérias do gênero *Azospirillum* sp. são cosmopolitas e não estão restritas a uma única família botânica. De modo geral, todos os mecanismos das bactérias do gênero *Azospirillum* sp. relatados para promoção de crescimento de plantas podem estar interligados, conforme descrito por Bashan and de-Bashan (2010), que propuseram a "teoria de múltiplos mecanismos", onde um mecanismo estimula o outro e criam um efeito benéfico maior nas plantas. Assim, os estudos de caracterização fenotípica e molecular podem ajudar a elucidar os mecanismos exercidos por bactérias desse gênero e revelar o uso das BPCPs como uma das principais estratégias para práticas agrícolas sustentáveis (Fukami et al. 2018).

1.4 Caracterização de bactérias com potencial para promoção de crescimento de plantas

O conhecimento sobre a diversidade microbiana, com destaque para bactérias promotoras de crescimento vegetal, em vista do seu potencial biotecnológico, tem facilitado a compreensão das funções desempenhadas por esses micro-organismos no ambiente terrestre e nas interações com plantas. Para tal fim, é necessário realizar a caracterização desses micro-organismos (Rodrigues 2016a).

As técnicas mais utilizadas na identificação de bactérias são baseadas nos métodos fenotípicos, que compreendem os dados obtidos através da caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica que são empregados nos laboratórios de microbiologia com a finalidade de conhecer a diversidade metabólica desses micro-organismos, bem como para fins taxonômicos (Figueiredo et al. 2010).

A primeira etapa de identificação é a caracterização morfológica, que inclui avaliações das colônias (forma, margem, elevação, tamanho, textura, aparência, pigmentação, cor e detalhe ótico) e avaliações culturais (forma, formação de endósporo, flagelos, tipo de parede celular) (Jesus et al. 2005, Videira et al. 2007). No que se refere às caracterizações fisiológicas e bioquímicas, são inclusas informações sobre cultivo e adaptabilidade, bem como crescimento em diferentes temperaturas, valores de pH, concentrações diferentes de sal e açúcares (Videira et al. 2007), além de produção de ácido-indolacetico (AIA), fixação biológica de nitrogênio (Kochar e Srivastava 2012), solubilização de fosfatos (alumínio, cálcio e ferro) e outros nutrientes inorgânicos (Shahid et al. 2012, Sharma et al.2013). No entanto, apesar dos métodos fenotípicos serem considerados a base para identificar e classificar os micro-organismos, estes não são o bastante para inferir sobre a taxonomia dos mesmos (Figueiredo et al. 2010). Assim, a combinação entre os métodos fenotípicos e genotípicos é necessária para uma descrição mais confiável e informativa a respeito da classificação das bactérias (Videira et al. 2007).

Os métodos genotípicos (DNA ou RNA) estão relacionados com os estudos de taxonomia moderna de bactérias como consequência do progresso tecnológico e contribuem para o conhecimento da diversidade dos micro-organismos (Moreira et al. 2010). Dentre as metodologias empregadas estão as técnicas baseadas em determinação do grau de similaridade de DNA genômico entre dois micro-organismos e sequenciamento de genes conservados (Bull 1992). O sequenciamento dos genes que codificam o RNA ribossomal 16S tem sido um dos mais estudados, uma vez que os RNAs ribossomais são considerados como cronômetros moleculares por apresentarem regiões altamente conservadas entre regiões variáveis e funções altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução, além de não sofrerem mudanças por alterações no meio ambiente (Moreira et al. 2010). Atualmente, o rRNA 16S apresenta os requisitos

que o caracterizam como um marcador filogenético universal, assim, os resultados obtidos através do sequenciamento desse gene podem ser comparados com outras sequências depositadas em bancos de dados (Moreira et al. 2010). De modo geral, as informações difundidas pela combinação dos métodos fenotípicos e genotípicos dentro de uma abordagem polifásica são imprescindíveis e podem ajudar a compreender os mecanismos de interação entre bactérias fixadoras de nitrogênio de *Azospirillum* sp. com *J. corumbensis*.

Encontram-se na literatura, inúmeras descrições sobre os benefícios da interação entre bactérias e plantas, principalmente em leguminosas e gramíneas (Beneduzi et al. 2013). No entanto, poucos estudos têm destacado os benefícios da interação entre bactérias e frutíferas (Rodrigues 2016a), principalmente nativas. Assim, a importância da realização desse trabalho com *J. corumbensis* é o fato de que esta espécie tem grande potencial de utilização tanto ambiental quanto social. Além disso, é interessante observar se *J. corumbensis* pode se beneficiar da interação com BPCPs do gênero *Azospirillum*. Portanto, a hipótese formulada para este trabalho é que bactérias do gênero *Azospirillum* sp. se associam a parte aérea, raiz e solo rizosférico de *J. corumbensis* e apresentam propriedades importantes para o crescimento vegetal.

Deste modo, o desenvolvimento de pesquisas que visam estudar a interação de bactérias diazotróficas e plantas frutíferas torna-se uma importante ferramenta para a identificação e seleção de estirpes com características para a promoção do crescimento vegetal. A utilização de bactérias diazotróficas pode representar uma alternativa sustentável ao modelo atual de produção agrícola, como insumos para substituição, pelo menos parcial, de fertilizantes e agrotóxicos, sem causar prejuízos ao ecossistema.

2. Objetivos

2. 1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência, isolar e caracterizar bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* em *Jacaratia corumbensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o número de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas a *J. corumbensis*;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados bacterianos quanto à morfologia, produção de ácido-indolacético (AIA), solubilização de fosfato de cálcio e alumínio, produção de amilase, fosfatases ácida e alcalina;
- Avaliar a variabilidade genética dos isolados bacterianos.

3. Referências Bibliográficas

Aguiar LF, Almeida CA, Camargos LS (2012) A Caracterização bioquímica da composição do cerne de Jaracatiá (*Jaracatia spinosa*). Act Igu 1:65-71.

Bashan Y, de-Bashan LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. Adv Agron 108:77-136. doi: 10.1016/S0065-2113(10)08002-8.

Bashan YB, de-Bashan LE, Prabhu S, Hernandez J-P (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations e practical perspectives (1998-2013). Plant Soil, 378:1-33.

Beijerinck MW (1925) Über ein Spirillum, welches freien Stickstof binden kann. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt Abt 63:353.

Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Passaglia LMP (2013) Diversity e plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. Appl Soil Ecol, 63:94-104. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.08.010.

Bull AT, Goodfellow M, Slater JH (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. Annu Rev Microbiol 46:219-246. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.001251.

Carvalho NL, Zabot V (2012) Nitrogênio: nutriente ou poluente. Rev Eletrônica Gest Educ Tecnol Ambient (e-ISSN: 2236-1170) 6:960-974.

Carvalho FA, Renner SS (2014) The phylogeny of the Caricaceae. In: R. Ming e P. H. Moore (ed) Genetics e Genomics of Papaya. Springer, New York, NY, pp 81–94.

Cavalcanti NB, Resende GM, Brito LTL (2009) Efeito de diferentes substratos no crescimento do mamãozinho-de-veado. Eng Amb 6:434-446.

Cavalcanti NB (2004) Utilização do mamãozinho de veado na alimentação dos animais na seca. Instruções técnicas da Embrapa Semi-Arido, Petrolina. https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/154732/1/INT60.pdf . Acesso em 27 Mai 2019.

Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol Biochem, 42:669-678.

Damasceno GA, Souza PR (2010) Sabores do Cerrado e Pantanal. Editora UFMS, Campo Grande-MS.

Damasceno Junior PC, Pereira TNS, Silva Filho F, Reis MVM., Pereira MG (2015) Genetic diversity in two species of Caricaceae and their genetic relationship to *Carica papaya* L. Rev Ciênc Agron, 46:733-739.

DSMZ (2018) Prokaryotic nomenclature up-to-date. https://www.dsmz.de/ bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryoticnomenclature-up-to-date.html. Acesso em: 28 out 2018.

Fachinello JC, Nachtigal JC, Kersten E (2008) Fruticultura: fundamentos e práticas. Pelotas.

Fao (2016) Food e Agriculture Organization of the United Organizations. Productio. Crops Primary. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 19 out 2018.

Fernandes MF, Fernandes RPM, Rodrigues, LS (2001) Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. Pesq Agrop Bras 36:1509-1517. doi: 10.1590/S0100-204X2001001200008.

Fernandes-Júnior PI, Duarte PGM, Perin L, Silva LM, Baraúna AC, Alves FM, Zilli JE (2013) Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula*

(Poaceae) in the Brazilian Amazon. Rev Biol Trop 61:991-999. doi: 10.15517/rbt.v61i2.11238.

Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum* brasilense. FEMS Microbiol Lett 326:99-108. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x.

Figueiredo MDVB, Seldin L, Araujo FF, Mariano RDLR (2010) Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari D (eds) Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology Monographs. Springer, Berlin, Heidelberg pp 21-43.

Fukami J, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria M (2016) Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. AMB Express 6:1. doi: 10.1186/s13568-015-0171-y.

Fukami J, Cerezini P, Hungria M (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Express 8:73. doi: 10.1186/s13568-018-0608-1.

Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS, Dunfield KE (2013) Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. Am J Bot 100:1738-1750.

Giulietti AM, Oliveira RP, Santos HA, Carneiro-Torres DS, Limad CT (2018) Flora da Bahia: Caricaceae. Sit Ser Ciênc Biol. doi: 10.13102/scb3412.

Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Sci. doi: 10.6064/2012/963401.

Hassler M (2019) World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version Nov 2018). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019

Annual Checklist (Roskov Y, Ower G, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, DeWalt RE., Decock W., Nieukerken EV, Zarucchi J, Penev L., eds.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X. http://www.catalogueoflife.org/col/details/database/id/141. Acesso em: 27 Mai 2019.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant Soil 331:413-425.

Hungria M (2011) Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Documentos, 325. Embrapa Soja, Londrina. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29676/1/Inoculacao-com-*Azospirillum*.pdf . Acesso em: 28 Mai 2019.

Jesus EDC, Moreira FMS, Florentino LA, Rodrigues MID, Oliveira MS (2005) Leguminosae nodulating bacteria diversity from three different land use systems in Brazilian Western Amazon. Pesq Agropec Bras 40:769-766. doi: 10.1590/S0100-204X2005000800006.

Jiménez VM, Mora-Newcomer E, Gutiérrez-Soto MV (2014) Biology of the papaya plant. In: Genetics e Genomics of Papaya. Springer, New York, pp 17-33.

Kaschuk G, Hungria M (2017) Diversity and importance of diazotrophic bacteria to agricultural sustainability in the tropics. In: Azevedo JL, Quecine MC. (Eds) Diversity and benefits of microorganisms from the tropics, Part III. Springer International Publishing, Cham, pp 269-292. doi: 10.1007/978-3-319-55804-2_12.

Kinupp VF (2007) Plantas Alimentícias não convencionais da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Leff E (2002) Agroecologia e saber ambiental. In: Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável. Porto Alegre, pp. 36-51.

Kochar M, Srivastava S (2012) Surface colonization by *Azospirillum brasilense* SM in the indole-3-acetic acid dependent growth improvement of sorghum. J Basic Microbial 52:123-131. doi: 10.1002/jobm.201100038.

Lleras E (2015) Caricaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6680>. Acesso em: 27 Mai 2019.

Lima JLS (1984) O mamãozinho ou mamão de veado: importância e uso. Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-árido, Embrapa-CPATSA, Petrolina-PE. https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/132355/1/SDC31.pdf. Acesso em: 27 Mai 2019.

Martínez-Ramos M (1985) Claros, ciclos vitales de los árboles tropicales y regeneración natural de las Selvas Altas Perennifolias. In: Gómez-Pompa: Investigaciones sobre la regeneración de Selvas Altas en Veracruz (CFP A Del Amo, S Del Amo, eds.). Alhambra Mexicana, S.A. de C.V. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. México, pp. 191-239.

Mia MAB, Shamsuddin ZH, Mahmood M (2010) Use of Plant Grouth Promoting Bacteria in Banana: A new insight for sustainable Banana Production. Int J Agr Biol 12:459-467.

Moraes LFD, Assumpção JM, Luchiari C, Pereira TS (2006) Plantio de espécies arbóreas nativas para a restauração ecológica na reserva biológica de Poço das Antas. Rod 57:477-489. doi: 10.1590/2175-7860200657307.

Moreira FMS, Silva K, Nóbrega RSA, Carvalho F (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. Comun Sci 1:74-99.

Pereg L, de-Bashan LE, Bashan Y (2016) Assessment of affinity e specificity of *Azospirillum* for plants. Plant Soil 399:389-414. doi: 10.1007/s11104-015-2778-9.

Pott A, Pott VJ (1994) Plantas do Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá-MS.

Porter BW, Zhu YJ, Webb DT, Christopher DA (2009) Novel thigmomorphogenetic responses in *Carica papaya*: touch decreases anthocyanin levels and stimulates petiole cork outgrowths. Ann Bot 103:847-858. doi: 10.1093/aob/mcp009.

Oliveira JRP, Trindade AV (2000) Propagação e formação do pomar. Mamão. Produção: aspectos técnicos. In: Comunicação para Transferência de Tecnologia, Embrapa. Brasília, DF, pp. 20-25.

Rodrigues PSL (2016a) Caracterização molecular e de promoção de crescimento de plantas por bactérias diazotróficas associadas à frutíferas tropicais. Campos dos Goytacazes, Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (Eds.) (2014) The Prokaryotes: Gammaproteobacteria. Springer, Berlin.

Shahid M, Hameed S, Imran A, Ali S, van Elsas JD (2012) Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp. Fs-11. World J Microbiol Biotechnol 28:2749-2758. doi: 10.1007/s11274-012-1086-2.

Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus, 2:587. doi: 10.1186/2193-1801-2-587.

Souza MST, Baura VA, Santos SA, Fernandes- Júnior PI, Junior FBR, Marques MR, Paggi GM, Brasil MS (2017) *Azospirillum* spp. from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity e plant growth promotion potential. World J Microbiol Biotechnol 33:81. doi: 10.1007/s11274-017-2251-4.

Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with the descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can J Microbiol 24:967-980. doi: 10.1139/m78-160.

Viana TFC (2016) Isolamento, caracterização morfológica e molecular de bactérias endofíticas e epifíticas em espécies de Bromeliaceae de bancadas lateríticas, Corumbá, Mato Grosso do Sul. Dissertação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Videira SS, Simões-Araújo JL, Baldani VLD (2007) Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. Documentos (INFOTECA-E). Embrapa Agrobiologia, Seropédica. https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/629417/1/doc234.pdf. Acesso em: 28 Maio 2019.

4. ARTIGO

Ocorrência, Isolamento e caracterização de *Azospirillum* sp. em *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze

Artigo a ser submetido na revista Plant and Soil

Ocorrência, isolamento e caracterização de *Azospirillum* em *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze

Romário Crisostomo de Oliveira[1,2], Valdineide Maria da Silva[2], Marcus Vinícius Santiago Urquiza[3], Gecele Matos Paggi [2,4], Marivaine da Silva Brasil[2,4]

[1]Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil

[2]Laboratório de Microbiologia, Ciências Biológicas, Campus do Pantanal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CEP 79304-902, Corumbá, MS, Brasil

[3]Laboratório de Ecologia, Ciências Biológicas, Campus do Pantanal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CEP 79304-902, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil

[4]Laboratório de Genética, Ciências Biológicas, Campus do Pantanal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CEP 79304-902, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil

*E-mail para correspondência: marivaine.brasil@ufms.br.

4.1 Abstract

Aims: Record the occurrence, to isolate and to characterize *Azospirillum* bacteria from *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze.

Methods: To verify and isolate bacteria we performed the Most Probable Number (MPN) approach, using the semisolid culture mediums NFB and LGI (nitrogen-free). We isolated 147 bacteria, from that, 50 presented a diazotrophic profile. Those 50 bacteria were then used to evaluate production of certain substances involved in plant growth promotion, such as aluminum and calcium phosphate solubilization, amylolytic and acid and alkaline phosphatase activities, and indolacetic acid (IAA) production. The strains genetic variability was analyzed using the Box A1R-PCR technic.

Results The Most Probable Number was not significantly different between the two studied areas. The bacteria strains presented high phenotypic and genotypic variation. Most bacteria strains were obtained from NFb medium, suggesting that they may belong to *Azospirillum* genus. From the 50 bacteria strains, 36% produced IAA, 16% solubilized calcium phosphate, 24% presented acid phosphatase activity, 22% presented alkaline phosphatase activity, and 66% presented amylolytic activity, suggesting that these strains presented potential for plant growth promotion.

Conclusions: Thus the isolates may possibly stimulate plant growth of *Jacaratia corumbensis.*

Keywords Jaracatiá, diazotrophic, FBN, Box A1R-PCR

Nomenclatura:

AIA- Ácido Indolacético
NMP- Número Mais Provável
FBN- Fixação Biológica de Nitrogênio
DNA- ácido desoxirribonucleico
IE- Índices Enzimáticos
PCR- reação em cadeia da polymerase
RNAr – RNA ribossômico
BPCPs- Bactérias promotoras de crescimento de plantas

4.2 Introdução

Jacaratia corumbensis O. Kuntze (Jaracatiá) é uma frutífera nativa pertencente à família botânica Caricaceae e por isso é considerada um mamão (Kinupp 2007). É conhecido também como "Yaca ra ti a", que em Tupi-Guarani significa "indivíduo de fruto cheiroso", é uma planta arbustiva que varia de 1 a 10 metros de altura e possui uma copa que chega a 3,5 metros (Pott e Pott 1994).

Do ponto de vista ambiental, o jaracatiá é uma espécie nativa que pode ser indicada para recuperação de áreas degradadas (reflorestamento e planejamentos agroecológicos), pois se adapta às áreas abertas e apresenta resistência às geadas e iluminação direta (Lorenzi 2002; Lima e Pirani 2002). Do ponto de vista social, o fruto pode ser explorado gastronomicamente, por seu sabor único e característica exótica (Bednarczuk et al. 2010). As comunidades que utilizarem o fruto como fonte de renda, terão a oportunidade de explorar sustentavelmente a espécie, agregando valor e incentivando a conservação (Lorenzi 2002; Lima and Pirani 2002). As plantas de *J. corumbensis* são utilizadas por produtores agroecológicos, ou mesmo agricultores familiares e comunidades tradicionais, como alimento (Leff 2002). Também são consideradas como plantas de aproveitamento total, já que se pode utilizar o indivíduo completamente: fruto, caule e raiz (Moraes et al. 2006). Na Caatinga (Nordeste do Brasil) o sistema subterrâneo dessa espécie (xilopódio), que apresenta 30% de proteína bruta, é utilizado na suplementação alimentar do gado e, em Mato Grosso do Sul, da raiz ralada, a população ladarense e corumbaense prepara doce e rapadura, semelhante ao produzido do caule do mamão comum (Damasceno Junior e Souza 2010).

No Brasil, essa planta já foi registrada em diferentes formações florestais, como nas regiões semiáridas do Nordeste (Cavalcanti et al. 2009), Tocantins, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (Aguiar et al. 2012; Hassler 2019). Sua

ocorrência já foi registrada em outros países como na Argentina, Bolívia e Paraguai (Hassler 2019). No Brasil, atualmente, *J. corumbensis* encontra-se restrita a fazendas tradicionais ou a viveiros, onde essa planta nativa está preservada. Um dos fatores da ocorrência restrita dessa espécie é a perda de habitats por fragmentação florestal que vem ocorrendo nas últimas décadas. Outros fatores também contribuem para a perda da biodiversidade em ecossistemas nativos, como o uso incorreto das técnicas de manejo do solo e de plantas (Fachinello et al. 2008), bem como a utilização de fertilizantes agrícolas que causam danos como eutrofização do solo, contaminação do lençol freático e aumento do efeito estufa (Carvalho and Zabot 2012). Para evitar esses problemas, buscam-se práticas agrícolas sustentáveis que visam conciliar a produtividade e conservação ambiental com baixo custo. Neste contexto, a interação entre micro-organismos do solo e plantas recebe atenção devido a relação benéfica que estabelecem (Bashan et al. 2014), com destaque para a utilização de micro-organismos que promovem o crescimento vegetal, sem a utilização de insumos agrícolas (Compant et al. 2010; Glick 2012; Rodrigues 2016a).

Um dos gêneros de micro-organismos mais promissores e muito estudado em relação à sua ação como promotor de crescimento vegetal é o *Azospirillum*. Esses micro-organismos apresentam benefícios que vão além da fixação biológica de nitrogênio, como a produção de fitormônios (que induzem o crescimento de raízes e melhoram a absorção de água e nutrientes pelas plantas), solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, controle de fitopatógenos, tolerância sistêmica induzida, bem como resistência a estresses bióticos e abióticos (Fukami et al. 2018).

Esses microrganismos podem se associar a uma grande variedade de espécies vegetais (Pereg et al. 2016). Deste modo, a pesquisa sobre ocorrência, variabilidade genética e eficiência de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* em plantas de

Jacaratia corumbensis dentro de uma abordagem polifásica (caracterização fenotípica e molecular) pode ajudar a compreensão da relação planta/bactéria, assim como a descoberta de estirpes promissoras para uso em programas de manejo e conservação destas plantas e aplicação biotecnológica. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi registrar a ocorrência, isolar e caracterizar bactérias do gênero *Azospirillum* associadas à *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Amostragens das plantas e áreas de estudo

Amostras de folhas, raízes e solo rizosférico foram coletadas (em triplicata) de seis indivíduos de *J. corumbensis* distribuídos em duas localidades na região do Pantanal de ocorrência natural da espécie: Assentamento Taquaral (plantas 1, 2 e 3) e Assentamento Jacadigo (plantas 4, 5, e 6) (Figura 2, Tabela 1). As amostras foram colocadas individualmente em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/*Campus* do Pantanal, para a contagem e o isolamento das bactérias.

Tabela 1. Coordenadas dos pontos de coleta de *J. corumbensis* e relação de plantas coletadas em cada ponto.

Assentamento Taquaral	**Coordenadas**
Planta 1	19°06'05.7" S 057°41'46.3" O
Planta 2	19°06'01.7" S 057°41'50.2" O
Planta 3	19°06'04.6" S 057°41'44.5" O
Assentamento Jacadigo	**Coordenadas**
Planta 4	19°12'51.8" S 057°49'33.7" O
Planta 5	19°12'51.7" S 057°49'34.6" O
Planta 6	19°12'53.3" S 057°49'36.1" O

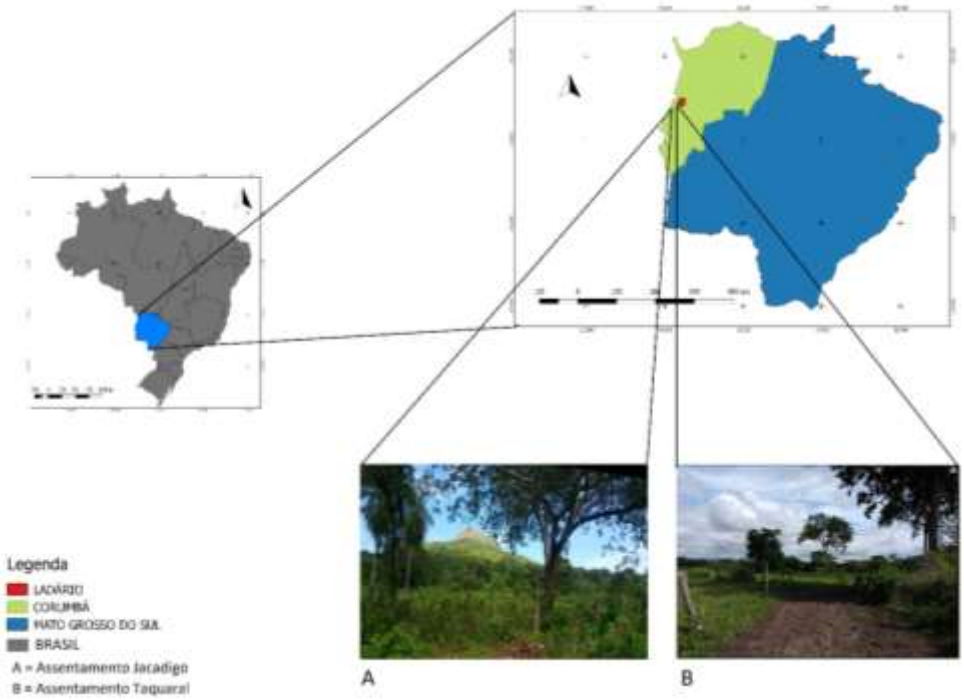

Figura 2. Áreas de coleta de amostras de solo rizosférico, raiz e folhas de *J. corumbensis*. (A) Assentamento Jacadigo; (B) Assentamento Taquaral.

4.3.2 Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas

As amostras de folhas, raízes e solo rizosférico de cada planta foram separadas e processadas de acordo com metodologia descrita por (Döbereiner et al. 1995). Para tal, as folhas e raízes foram lavadas em água corrente, fragmentadas em pedaços menores, homogeneizadas e pesadas em três repetições de 10 g e, posteriormente, foram maceradas em 90 mL de solução de sacarose 5%. O solo rizosférico também foi homogeneizado, pesado 10 g em três repetições e transferidos para frascos contendo 90 mL de solução de sacarose 5%, permanecendo sob agitação constante a 150 rpm por 20 minutos em mesa de rotação orbital, para fragmentação dos agregados do solo. A solução resultante de cada amostra foi diluída seriadamente até 10^{-5}. De cada diluição, uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em frascos contendo 5 mL de meios semissólidos NFb e LGI (isentos de nitrogênio), semi-seletivos para os gêneros *Azospirillum* sp. e *Nitrospirillum* sp. (anteriormente *Azospirillum amazonense*) (Baldani et al. 2014).

Para cada meio foram utilizados três frascos por diluição, que foram incubados em estufa a 28 ºC por cinco dias. Após esse período, foi avaliada a população das bactérias pelo método do Número Mais Provável (NMP), baseando-se na presença de película característica (em forma de véu) de bactérias diazotróficas, seguindo a Tabela de McCrady para três frascos por diluição (Döbereiner et al. 1995). Os resultados da contagem do NMP de bactérias dos dois locais foram submetidos à análise de variância, seguida de Tukey a 5% de probabilidade.

O isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio foi realizado após a contagem, utilizando-se as amostras dos frascos das últimas diluições com crescimento positivo, que foram repicadas sucessivamente para os meios semissólidos e sólidos semi-específicos NFb e LGI (isentos de nitrogênio), respectivamente e, após formação de película característica, foram inoculadas em placas de meio sólido Batata, para confirmação da

pureza (Baldani et al. 2014). Posteriormente, os isolados foram estocadas em glicerol 50%.

4.3.3 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos

I. Caracterização morfológica

Para caracterização morfológica, os isolados foram cultivados em meio sólido Batata, sendo que a morfologia das colônias nesse meio foi avaliada visualmente. As colônias foram analisadas até o sétimo dia de crescimento quanto à forma, margem, elevação, tamanho, textura, aparência, pigmentação, cor e detalhe ótico, seguindo recomendações do Manual de Bergey (Garrity et al. 2004). Os dados provenientes da caracterização morfológica foram analisados utilizando o Programa Past versão 3.0 (Hammer et al. 2001), a partir da transformação binária dos dados e da construção de uma matriz 0-1, onde 0 indica a ausência de uma determinada característica e 1 a presença da mesma. As características geradas para cada isolado bacteriano foram comparadas e as suas semelhanças estimadas pelo Índice de Jaccard (J= a/(n-d)), sendo "a" o número de combinações com a presença de características, menos as combinações de ausência das mesmas, "d" o número de combinações de ausência de características e "n" o número de combinações possíveis. O índice de Jaccard foi obtido pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e os isolados bacterianos foram agrupados e representados graficamente por um dendrograma de similaridade.

II. Verificação e quantificação da produção de ácido-indolacético (AIA)

Para a estimativa da produção do AIA, foi feita previamente uma curva de calibração com diferentes concentrações de ácido-indolacético puro. Foi preparada uma

solução estoque da maior concentração (100 µg/mL de AIA puro) e feitas as soluções menos concentradas (5; 10; 15; 25; 50 µg/mL de AIA) a partir desse estoque, com a equação: $C_1.V_1=C_2.V_2$. Após esse procedimento quantificou-se as auxinas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540nm e posteriormente calculou-se uma equação tomando a média de absorbância de três repetições de cada diluição. A equação serviu para estimar os valores de AIA de cada isolado e com a seguinte descrição:

$$X = (ABS + 0,0278) / 0,0209 \text{ (R =de 0,9992)}$$

Onde: X = concentração de AIA,

ABS = intensidade da cor mensurada em espectrofotômetro

A capacidade de produção de AIA dos isolados foi analisada pela utilização do método descrito por Sarwar e Kremer (1995) com modificações descritas por Reis et al. (2004). Os isolados foram crescidos em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de meio Dygs, sob agitação constante de 100 rpm, a 30 ºC por 24 horas. Em seguida, 20 µL das culturas foram inoculados em meio NFb líquido com as seguintes modificações: acrescido e não de 100 µg/mL de DL-Triptofano, sem vitamina para meio de cultura, sem azul de bromotimol, contendo 0,1% de NH_4Cl_2 como fonte de nitrogênio e crescidas por 72 horas a 150 rpm no escuro. A ausência de corante se deve ao fato de que os resultados positivos são visualizados pela coloração rósea e a leitura é feita por espectrofotômetro. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 30 minutos e 1,0 mL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado a 2,0 mL do reagente de Salkowisk (1,0 mL de 0,5 M $FeCl_3$ em 49 mL de ácido perclórico 35%) e mantidos no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente. A produção do ácido-indolacético foi verificada através do teste colorimético (pela coloração rósea). Foram realizadas três repetições para cada isolado e o resultado foi uma média das três leituras de absorbância analisada em

espectrofotômetro em um comprimento de onda a 540 nm. A quantificação de AIA foi obtida pela equação acima descrita a partir da média das leituras.

III. Solubilização de fosfato de alumínio

A capacidade dos isolados em solubilizar fosfato de alumínio *in vitro* foi testada conforme metodologia desenvolvida por Sylvester-Bradley et al. (1982) utilizando-se meio de cultura Glucose-Levedura (GL), pH 6,5, contendo 10 g de manitol, 2 g de extrato de levedura, 6 g de K_2HPO_4 e 18 g de ágar por litro de meio, acrescido de 5,34 g de $AlCl_3$, para formar o precipitado de fosfato de alumínio. O $AlCl_3$ foi autoclavado separadamente antes da sua adição ao meio.

Previamente ao início do teste, os isolados foram crescidos em meio Dygs líquido, por 24h, em agitação constante de 150 rpm. Em seguida, 20µL foi inoculado em placa Petri contendo meio de cultura, descrito acima, com quatro repetições. O resultado positivo foi verificado através da formação de uma área translúcida em torno da colônia após sete dias. Os índices de solubilização (IS), foram obtidos a partir da razão do diâmetro do halo de solubilização (ØHS) pelo diâmetro da colônia (ØC) por meio da fórmula: IS=ØH/ØC. As linhagens foram classificadas em três grupos em relação ao índice enzimático: Baixo (IS<2); Médio (2<IS<4); e alto (IS<4) (Berraquero et al. 1976).

IV. Solubilização de fosfato de cálcio

A capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi testada em meio de cultura GL sólido (Sylvester-Bradley et al. 1982), contendo 10,0 g de glicose, 2,0 g de extrato de levedura e 5,0 g de ágar para 1 L pH 5,8. Depois de esterilizado e ainda no estado líquido, foram adicionados a 200 mL de meio, 50,0 mL de K_2HPO_4 (10%) e 100 mL de $CaCl_2$ (10%) para a formação de precipitado insolúvel de $CaHPO_4$. O meio foi então

cuidadosamente distribuído em placas de Petri a fim de evitar a formação de bolhas, que dificultam a visualização no halo de solubilização.

Previamente a análise de solubilização de fosfato de cálcio, os isolados foram crescidos em meio Dygs, por 24h, em agitação constante de 150 rpm. Em seguida, 20µL foram inoculados em placa Petri contendo meio de cultura, descrito acima, com quatro repetições. O resultado positivo foi verificado através da formação de uma área translúcida em torno da colônia após sete dias. Os índices de solubilização (IS), foram obtidos a partir da razão do diâmetro do halo de solubilização (ØHS) pelo diâmetro da colônia (ØC) por meio da fórmula: IS=ØH/ØC. As linhagens foram classificadas em três grupos em relação ao índice enzimático: Baixo (IS<2); Médio (2<IS<4); e alto (IS<4) (Berraquero et al. 1976).

4.3.4 Caracterização bioquímica dos isolados

I. Determinação da atividade fosfatase dos isolados

Para a detecção da atividade enzimática de fosfatase ácida *in vitro*, os isolados foram inoculados no centro de placas contendo meio salino (Nahas et al. 1994) contendo 1g de citrato de sódio, 1 g de NH_4Cl, 0,2 g de KCl, 1,2 g de $MgSO_4$, 0,1 g de $CaCl_2$, 10 g de glicose, 0,5 g de extrato de levedura, acrescido de 1,5% (p/v) de ágar, 1000 mL de água destilada, corrigindo-se o pH para 7,4. As placas foram incubadas por 2 a 3 dias à temperatura de 28 ºC. O resultado positivo foi verificado através da formação de uma área translúcida em torno da colônia. Mediu-se o diâmetro das colônias e, em seguida, as placas foram inundadas com solução de p-nitrofenilfosfato, para fosfatase ácida e com tampão-glicina 0,3 $mol.L^{-1}$, pH 9,0, para a fosfatase alcalina e incubadas a 37 ºC por 90 minutos. Após esse período mediu-se também o diâmetro do halo amarelo formado pela transformação do p-nitrofenilfosfato, resultante da atividade fosfatase ácida. A relação

entre os dois diâmetros constituiu o índice adotado para avaliar a habilidade do micro-organismo em produzir a enzima fosfatase.

II. Determinação da atividade amilolítica dos isolados

Os isolados foram cultivados em 5 mL de meio líquido Dygs por 24 h, em seguida alíquotas de 10 µL foram distribuídas em quatro pontos uniformemente em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (extrato de levedura-manitol-ágar) modificado pela substituição do manitol por amido como única fonte de carbono e sem a adição do azul de bromotimol (Oliveira et al. 2007). As culturas foram incubadas a 30 °C por sete dias. Após esse período, foi adicionada solução de iodine em toda a placa, sendo detectada a atividade amilolítica pela a formação de um halo transparente ao redor das colônias. Os índices enzimáticos (IE), foram obtidos a partir da razão do diâmetro do halo de solubilização (ØHS) pelo diâmetro da colônia (ØC) por meio da fórmula: IS=ØH/ØC. As linhagens foram classificadas em três grupos em relação ao índice enzimático: Baixo (IS<2); Médio (2<IS<4); e alto (IS<4) (Berraquero et al. 1976).

4.3.5 Análise da variabilidade genética das cepas isoladas

Para essa análise foram selecionados 50 isolados capazes de fixar nitrogênio em meio semi-específico NFb, pela formação de película aerotáxica. A extração do DNA dos isolados foi realizada seguindo o protocolo de Sambrook e Russel (2001). Para verificar a eficiência da extração e qualidade do DNA extraído de cada isolado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% durante 40 minutos a 80 volts. A quantificação do DNA foi verificada por comparação com padrão de peso molecular conhecido (LambdaTM, Invitrogen TM). A pureza do DNA foi verificada após a coloração com SyBR Gold + TA e visualização em um transluminador safe imagerTM invitrogen® de luz azul.

A reação de PCR foi realizada através da amplificação de regiões conservadas e repetitivas do DNA com o primer BOX A1R (5'−CTACGGCAAGGCGACGCTGACG−3') (Versalovic et al. 1994). A reação de amplificação foi conduzida para um volume de 25 µL: DNA (10 ng/µL); tampão 1X; $MgCl_2$ 1,75 mM; dNTPs 0,3 mM; oligonucleotídeo 1µM e Taq DNA polimerase, 0,75 U. A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min; 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min 53 °C) e extensão (6 min a 65 °C); 1 ciclo de extensão final a 65 °C por 16 min; manutenção final a 4 °C, com o uso do termociclador (Applied Biosystems). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 90 V em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1 X, por 2h20min e corado com SyBR Gold + TA e visualização em um transluminador safe imagerTM invitrogen® de luz azul.

Para análise da variabilidade genética dos isolados, os perfis de bandas obtidos foram transformados em uma matriz binária e em seguida utilizados para obter um dendrograma de similaridade calculado através do Coeficente de Jaccard e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average), utilizando o software Past versão 3.0 (Hammer et al. 2001).

4.3.6 Análises dos dados

Os dados provenientes da quantificação de ácido-indolacético, solubilização de fosfato de cálcio e alumínio, atividades fosfatase ácida, alcalina e atividade amilolítica foram previamente submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro-wilk, utilizando-se o software Past versão 3.0 (Hammer et al. 2001), onde foi constatada distribuição normal dos dados com $p>0,05$ (Zar 2009). Posteriormente, foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de

probabilidade com uso dos procedimentos disponíveis no Sisvar versão 5.6 (Ferreira 2014).

4.4 Resultados

4.4.1 Ocorrência, contagem e isolamento de bactérias diazotróficas

Os resultados obtidos para ocorrência de bactérias diazotróficas nas áreas de estudo mostraram a presença destas em todas as partes amostradas, porém, com baixa ocorrência na parte aérea no meio NFb e sem ocorrências no meio LGI para as plantas das duas localidades, respectivamente. O número de bactérias diazotróficas associadas à *J. corumbensis* não apresentou diferença significativa tanto entre as áreas de coleta (Tabela 2), como também entre os meios de cultura (Tabela 3). A ocorrência de bactérias diazotróficas em maior número foi observada no solo rizosférico das plantas 1, 2 e 3, localizadas no Assentamento Taquaral, com 5,42 $x10^6$, 3,25 $x10^5$ e 5,42 $x10^6$ células/g de matéria fresca, respectivamente, e da planta 5, localizada no Assentamento Jacadigo, com 2,53 $x10^5$ células/g de matéria fresca, ambas no meio NFb. No meio LGI, o maior número de bactérias também foi observado no solo rizosférico, com destaque para a planta 6, com 8,36 $x10^5$ células/g de matéria fresca. A ocorrência de bactérias diazotróficas nas duas áreas pode ser observada na Tabela 4, onde estão listados o número de bactérias por raiz e parte aérea de cada planta e solo rizosférico, bem como os meios de cultura.

Tabela 2. Média do NMP de bactérias diazotróficas por g/matéria fresca associadas a *J. corumbensis* em duas localidades no Pantanal Sul Matogrossense: Assentamento Jacadigo e Assentamento Taquaral.

Área de Coleta	Média do NMP
Assentamento Jacadigo	2,29 a
Assentamento Taquaral	3,13a
CV%	86,66

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Média do NMP de bactérias diazotróficas por meio de cultura.

Meio de cultura	Média do NMP
LGI	2,43 a
NFb	2,98 a
CV%	87,52

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Número de bactérias diazotróficas associadas a *J. corumbensis* em duas localidades no Pantanal Sul Matogrossense: Assentamento Jacadigo e Assentamento Taquaral.

Áreas de estudo	*Jacaratia corumbensis*	Nº de bact/g de matéria fresca (NFb)			Nº de bact/g de matéria fresca (LGI)		
		Parte aérea	Raiz	Solo rizosférico	Parte aérea	Raiz	Solo rizosférico
Assentamento Taquaral	Planta 1	0,83 $x10^4$	3,16 $x10^4$	5,42 $x10^6$	Nd	1,43 $x10^4$	Nd
	Planta 2	Nd	0,26 $x10^4$	3,25 $x10^5$	Nd	0,93 $x10^4$	0,8 $x10^4$
	Planta 3	Nd	2,5 $x10^5$	5,42 $x10^6$	Nd	0,83 $x10^4$	2,5 $x10^4$
Assentamento Jacadigo	Planta 4	Nd	Nd	Nd	Nd	0,36 $x10^4$	0,13 $x10^4$
	Planta 5	0,1 $x10^4$	2,03 $x10^4$	2,53 $x10^5$	Nd	0,13 $x10^4$	3,3 $x10^4$
	Planta 6	Nd	8,76 $x10^4$	Nd	Nd	0,3 $x10^4$	8,36 $x10^5$

Nd= Não detectado.

Foram obtidos 147 isolados bacterianos, sendo 132 provenientes do solo rizosférico e 15 isolados provenientes da raiz. No meio LGI não foi possível isolar bactérias provenientes das raízes (Tabela 5).

Tabela 5. Número de isolados bacterianos associados a *J. corumbensis* e sua distribuição em meios de cultivo semi-específíco.

Área de coleta	Meio de cultura	Raiz	Solo Rizosférico	Total
Taquaral	NFB	12	119	131
	LGI	0	5	5
Jacadigo	NFB	3	8	11
Total		15	132	147

4.4.2 Caracterização fenotípica e bioquímica dos isolados bacterianos

A análise das características morfológicas dos 147 isolados indicou que 53,8% apresentou forma circular, enquanto que 40,8% apresentou forma irregular. Outros 3,4% e 2% corresponderam às formas filamentosa e rizoide, respectivamente. Quanto à margem, 54,5% apresentou margem inteira, enquanto 27,8% apresentou margem irregular e 12,2% margem ondulada. Outros 3,5% e 2% corresponderam às formas filamentosa e rizoide, respectivamente. Com relação à elevação, 36,8% apresentou elevação elevada, 28,6% elevação plana, 25,8% elevação convexa e 8,8% elevação pulvinada. Quanto ao tamanho, 51,8% dos isolados apresentou colônias grandes, 29,2% apresentou colônias médias e 19% colônias pequenas. As variações quanto às texturas das colônias foram de 80,2% lisa e 19,8% rugosa e, para aparência, 66% brilhante e 34% opaca. Com relação à pigmentação, 90,4% das colônias não apresentou pigmentação, enquanto 9,6% apresentou. Em relação à cor, cerca de 82,4% dos isolados apresentou colônias cremes, 6,8% apresentou colônias amarelas, 4,8% apresentou colônias transparentes, 4% apresentou colônias brancas e 2% apresentou colônias rosas. Os

isolados apresentaram variações quanto ao detalhe ótico, sendo 62% translúcidos e 38% opacos.

O dendrograma de similaridade de características morfológicas dos isolados bacterianos associados a *J. corumbensis* apresenta alta variabilidade, sendo observados a formação de 7 grupos com 70% de similaridade (Figura 3). A composição dos grupos ocorreu da seguinte forma: os grupos 1, 2 e 3 apresentaram menor variabilidade fenotípica, sendo compostos por 9, 43 e 22 isolados, respectivamente, que apresentaram maior similaridade. Os grupos 4, 5, 6 e 7 apresentaram maior variabilidade fenotípica, sendo composto por 23, 19, 16 e 15 isolados, respectivamente, que apresentaram menor similaridade. Os isolados dos grupos 1, 2, 4 e 6 são provenientes dos meios de cultivo semissólidos NFb e LGI, enquanto que os isolados dos grupos 3, 5 e 7 são provenientes do meio de cultivo semissólido NFb. Os representantes dos grupos 1, 3 e 7 são oriundos do solo rizosférico e os demais grupos oriundos da raiz e solo rizosférico de *J. corumbensis*.

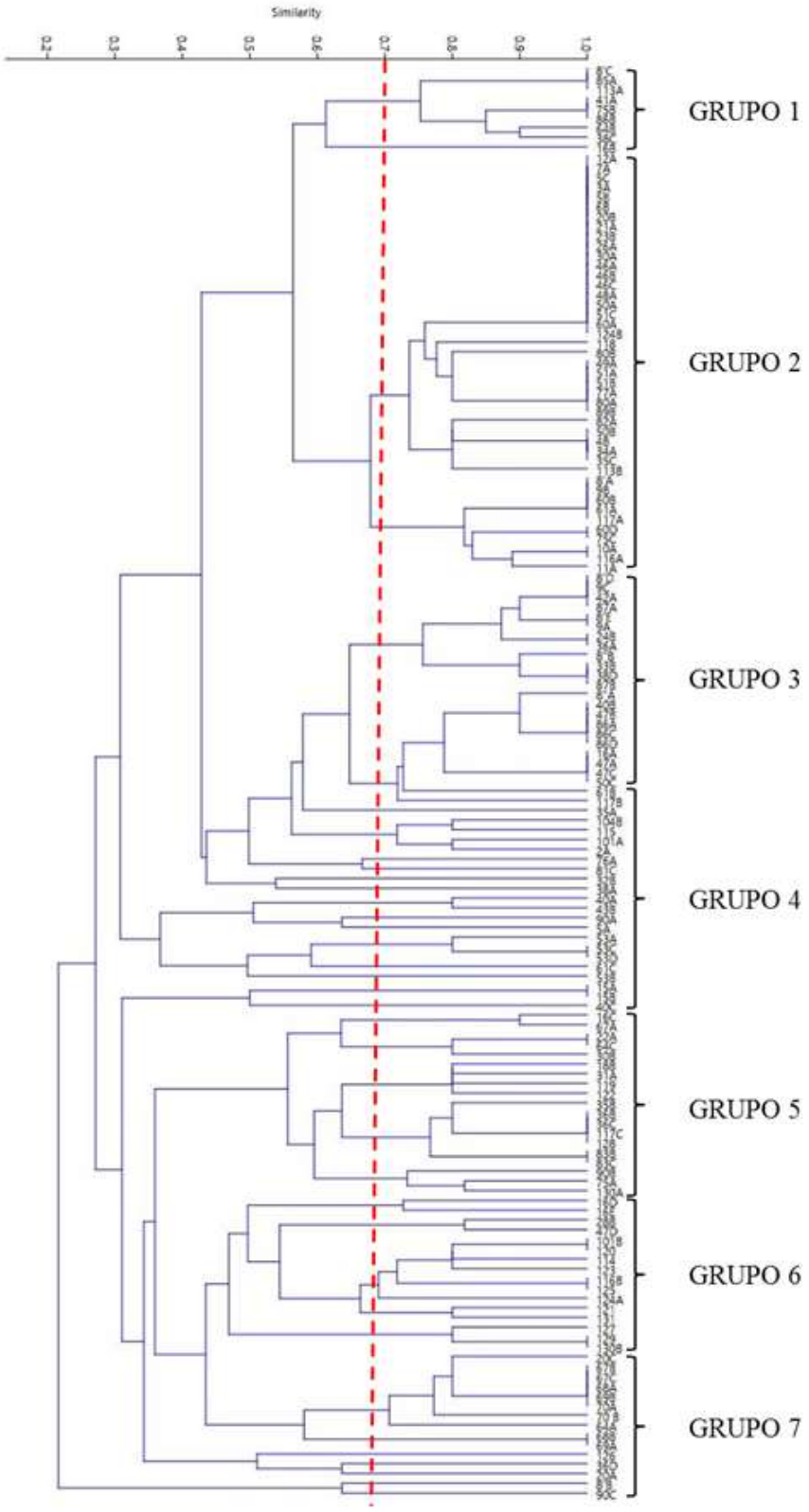

Figura 3. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para características morfológicas de 147 isolados bacterianos associados a *J. corumbensis*.

Dos 147 isolados bacterianos, 50 (34%) foram caracterizados como diazotróficas por terem formado película aerotáxica após cinco reinoculações sucessivas em meio semissólido semiseletivo (isento de nitrogênio) (Figura 4).

Os meios de cultivo utilizados para a avaliação de bactérias diazotróficas apresentaram resultados diferenciados. O meio com maior representatividade para o isolamento de bactérias diazotróficas foi o NFb. Enquanto que no meio LGI não foram observadas formações de películas aerotáxicas após sucessivas repicagens.

Assim, os isolados que apresentaram aspecto diazotrófico (Tabela 6) foram selecionados para os testes de produção de ácido-indolacético, solubilização de fosfatos (alumínio e cálcio), atividades das fosfatases ácida e alcalina, atividade amilolítica e análise de variabilidade genética pela técnica de BOX-PCR.

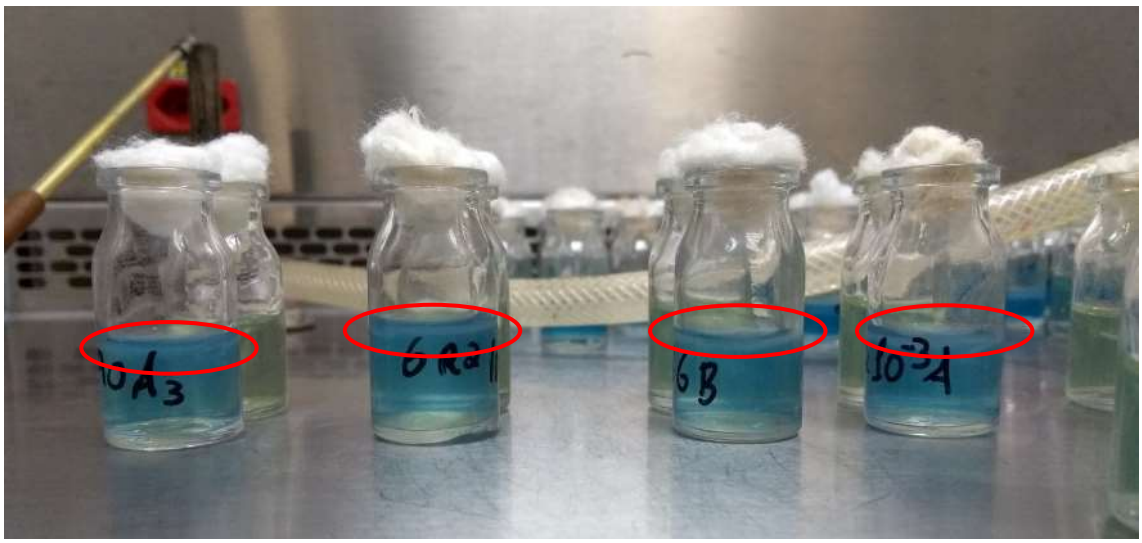

Figura 4. Isolados bacterianos com película (em destaque vermelho), confirmando o perfil diazotrófico.

Tabela 6. Relação de isolados bacterianos associados a *J. corumbensis* selecionados para os testes de potencial biotecnológico.

Origem dos isolados	Meio de Cultivo	Origem	Planta	Local
2A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
4B	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
5A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
5C	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
7A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
8IA	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
8IB	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
8ID	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
8IE	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
8IIB	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
10A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
16A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
16C	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
20A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
20B	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
20C	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
21A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
22A	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
32B	NFb	S. Rizosférico	1	Assent. Taq.
35B	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
35C	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.

36A	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
36B	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
36C	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
46A	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
46C	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
47A	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
47D	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
48A	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
49A	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
50B	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
50C	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
51A	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
51B	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
51C	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
53B	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
53D	NFb	S. Rizosférico	2	Assent. Taq.
76A	NFb	S. Rizosférico	3	Assent. Taq.
77A	NFb	S. Rizosférico	3	Assent. Taq.
82A	NFb	S. Rizosférico	3	Assent. Taq.
85A	NFb	S. Rizosférico	3	Assent. Taq.
86C	NFb	S. Rizosférico	3	Assent. Taq.
90C	NFb	S. Rizosférico	3	Assent. Taq.
122	NFb	S. Rizosférico	3	Assent. Taq.
124A	NFb	S. Rizosférico	6	Assent. Jac.
124B	NFb	S. Rizosférico	6	Assent. Jac.

125	NFb	S. Rizosférico	5	Assent. Jac.
126	NFb	S. Rizosférico	5	Assent. Jac.
128	NFb	S. Rizosférico	5	Assent. Jac.
130	NFb	S. Rizosférico	5	Assent. Jac.

S. rizosférico= Solo rizosférico; Assent. Taq. = Assentamento Taquaral; Assent. Jac= Assentamento Jacadigo.

A produção de AIA não foi observada em todos os 50 isolados bacterianos avaliados, porém, 36% dos isolados bacterianos foram capazes de produzir o ácido indolacético (AIA) *in vitro* na presença do DL-triptofano, no entanto, não foram capazes de produzir esse fitohormônio em meio de cultivo sem o acréscimo do DL-triptofano. A produção de AIA variou entre 3,82 a 21,27 μg/mL, onde os isolados 2A (21,27 μg/mL), 46A (17,81 μg/mL), 122 (14,61 μg/mL), 90C (14,27 μg/mL), 47A (10,69 μg/mL) e 46C (9,27 μg/mL) apresentaram os maiores valores de produção desse fitohormônio, respectivamente (Tabela 7).

Dos 50 isolados, apenas 8 (16%) foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* (Figura 5B). O índice de solubilização foi considerado baixo (IS<2), variando entre 1,37 a 1,87 mm, onde os isolados 16C e 48A apresentaram os maiores índices, com 1,82 e 1,87 mm, respectivamente (Tabela 7).

Nenhum dos isolados testados apresentou a capacidade de solubilizar fosfato de alumínio *in vitro*, não sendo observado crescimento bacteriano e nem a formação de halos (Figura 5A).

A atividade de fosfatase ácida foi detectada em 24% dos isolados bacterianos, sendo observada a presença de halos amarelos ao redor das colônias (formado pela transformação do p-nitrofenilfosfato), característico desta atividade (Figura 5 C e D). O índice enzimático variou entre 1,32 a 3,99 cm, no qual os isolados 4B (3,99 cm), 16C

(3,14 cm) e 126 (3,13 cm) apresentaram índice enzimático considerado alto (IE>3,1), respectivamente, enquanto que os isolados 10A (1,32 cm) e 46C (1,84 cm) apresentaram índice enzimático considerado baixo (IE<2) (Tabela 7).

A fosfatase alcalina foi detectada em 22% dos isolados bacterianos. O índice enzimático variou entre 1,46 a 5,25 cm, onde os isolados 4B (5,25 cm) e 8IA (3,1 cm) apresentaram índice enzimático alto (IE>3,0), enquanto que os isolados 10A (1,69 cm) e 51A (1,46 cm) apresentaram índice enzimático baixo (IE<2) (Tabela 7).

Dos 50 isolados avaliados, 32 (66%) apresentaram atividade amilolítica *in vitro*, com formação de halo de hidrólise de amido (Figura 5 E). O índice enzimático variou entre 1,83 a 4,5 mm. Os isolados 8ID, 16A, 20A, 50B e 50C, apresentaram os maiores índices enzimáticos (Tabela 7).

Tabela 7. Atividades enzimáticas e produção de ácido indolacético dos isolados bacterianos associados a *J. corumbensis*.

Identificação dos isolados	Solubilização de fosfato de cálcio (mm)	Atividade da Fosfatase Ácida (cm)	Atividade da Fosfatase Alcalina (cm)	Atividade Amilolítica (mm)	Produção de AIA ($\mu g\ ml^{-1}$)
2A	-	2,22 b	2,06 c	3,51 b	21,28 a
4B	-	3,99 a	5,25 a	-	-
5A	-	-	-	3,10 c	-
5C	-	-	-	-	-
7A	-	-	-	3,08 c	-
8IA	-	2,80 a	3,10 b	3,66 b	-
8IB	-	-	-	3,77 b	-
8ID	-	-	-	4,19 a	-
8IE	-	-	-	3,41 b	-
8IIB	-	-	-	3,07 c	-
10A	-	1,32 b	1,69 c	3,28 c	-
16A	-	-	-	4,17 a	-

16C	1,82 a	3,14 a	2,80 b	3,50 b	4,66 b
20A	-	-	-	4,25 a	5,14 b
20B	-	-	-	2,77 c	3,82 b
20C	-	-	-	2,46 d	-
21A	-	2,78 a	1,72 c	-	5,03 b
22A	-	-	-	3,56 b	-
32B	-	-	-	3,79 b	4,90 b
35B	-	-	-	3,75 b	-
35C	-	-	-	-	-
36A	-	-	-	-	-
36B	1,43 b	2,72 a	1,98 c	-	-
36C	-	-	-	3,65 b	-
46A	-	-	-	2,92 c	17,82 a
46C	-	1,84 b	1,56 c	-	9,25 b
47A	-	2,38 b	2,60 b	-	10,69 b
47D	-	-	-	2,84 c	5,90 b
48A	1,87 a	-	-	-	7,07 b
49A	-	-	-	-	6,43 b
50B	1,37 b	-	-	4,50 a	-
50C	-	-	-	4,04 a	6,14 b
51A	-	2,37 b	1,46 c	3,22 c	4,51 b
51B	1,66 a	2,94 a	2,21 c	2,36 d	-
51C	-	-	-	2,45 d	-
53B	-	-	-	3,05 c	-
53D	1,38 b	-	-	2,16 d	5,29 b
76A	-	-	-	2,69 c	-
77A	-	-	-	-	8,41 b
82A	-	-	-	-	-
85A	1,51	-	-	2,73 c	-
86C	-	-	-	-	-
90C	-	-	-	-	14,27 a
122	-	-	-	2,89 c	14,61 a
124A	1,63 a	-	-	-	-
124B	-	-	-	-	-
125	-	-	-	2,31 d	-
126	-	3,13 a	-	-	-

128	-	-	-	1,83 d	-
130	-	-	-	-	-
CV (%)	10,33	20,42	21,22	12,57	49,61

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não se diferem estatisticamente pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade; (-): Não detectado.

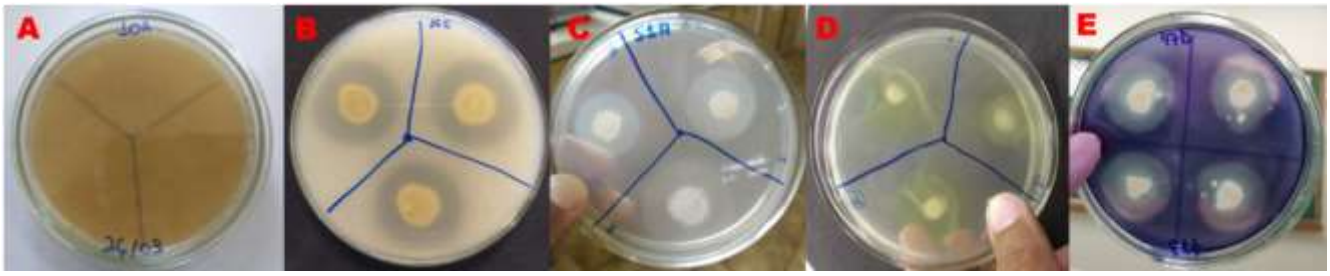

Figura 5. Detecção de atividades enzimáticas. **A-** Meio GL acrescido de fosfato de alumínio sem a detecção do crescimento e da atividade solubilizadora dos isolados; **B-** Meio GL acrescido de fosfato de cálcio com a detecção do crescimento de colônias e zona translúcida ao redor (halo), indicando atividade solubilizadora dos isolados; **C**- Formação de halo translúcido em Meio Salino; **D**- Detecção de halo amarelo formado pela transformação do p-nitrofenilfosfato. Ambos resultantes da atividade fosfatase ácida. **E-** Meio YMA acrescido de amido com a detecção do crescimento de colônias e zona translúcida ao redor (halo), indicando atividade amilolítica dos isolados.

4.4.3 Análise da variabilidade bacteriana por meio de BOX-PCR

O dendrograma do BOX A1R-PCR das bactérias diazotróficas associadas a *J. corumbensis* obtido pelo método de agrupamento UPGMA a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard, apresentou alta variabilidade, sendo observada a formação de 7 grupos com 77% de similaridade (Figura 6). Os perfis de bandas obtidos apresentaram alto grau de polimorfismo, com cerca de 78,26%, enquanto que 21,74% foram monomórficos.

A composição dos agrupamentos observados no dendrograma do BOX A1R-PCR com os isolados similares ocorre da seguinte forma: **Grupo 1** (36A, 47D); **Grupo 2** (2A, 7A 8ID, 8IIB, 47A, 8IE); **Grupo 3** (4B, 35C, 8IA, 10A, 8IB, 20B, 16A); **Grupo 4** (85A, 90C, 126, 125); **Grupo 5** (22A, 20A, 20C, 50C, 36C, 46C, 48A, 50B, 76A, 32B, 130, 53B, 49A, 77A, 86C); **Grupo 6** (36B, 51A, 51B, 51C, 124A, 35B, 124B, 21A, 5A, 16C, 82A) e **Grupo 7** (46A, 5C, 122, 128, 53D).

Os grupos 3, 5 e 6 foram os mais diversos, sendo compostos por 7, 15 e 11 isolados, respectivamente, que apresentaram menor similaridade. Os grupos 2, 4, e 7 foram os menos diversos, sendo composto por 6, 4 e 5 isolados, respectivamente, que apresentaram maior similaridade. O grupo 1, com dois isolados, divergiu bastante dos demais. Os isolados de todos os grupos são provenientes do meio de cultivo semissólido NFb. Os representantes dos grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 7 são oriundos do solo rizosférico, enquanto que os representantes do grupo 6 são oriundos da raiz e solo rizosférico de *J. corumbensis*.

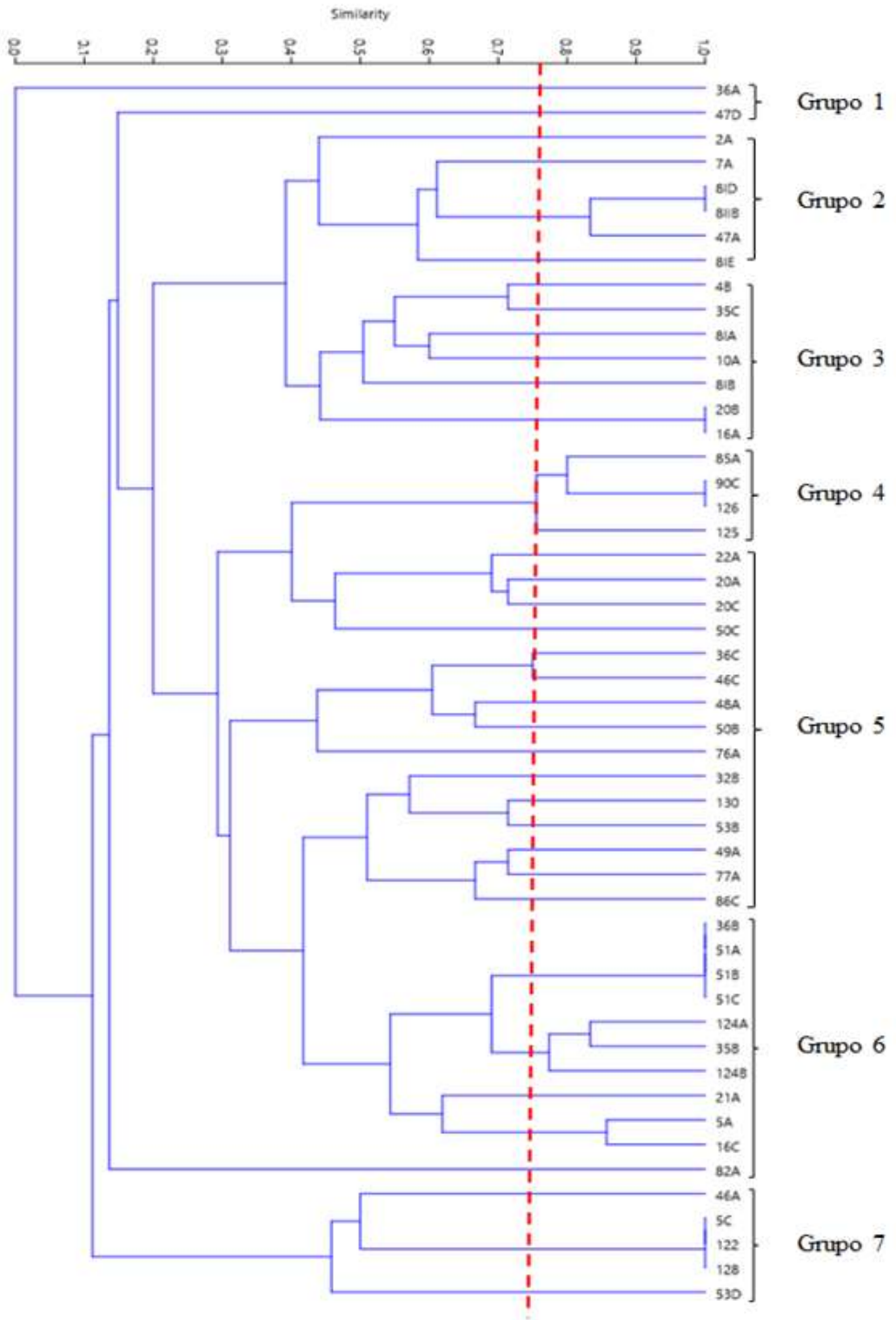

Figura 6. Dendrograma do BOX A1R-PCR construído pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard para análise da variabilidade genética dos isolados bacterianos diazotróficos associados a *J. corumbensis*.

4.5 Discussão

4.5.1 Ocorrência, contagem e isolamento de bactérias diazotróficas

A ocorrência de bactérias diazotróficas tem sido observada nos mais variados ecossistemas (Moreira et al. 2010). Neste estudo, observamos que *J. corumbensis*, apresentou ocorrência de bactérias diazotróficas nas duas áreas de estudo, Assentamento Taquaral e Assentamento Jacadigo, com maiores densidades entre 10^5 e 10^6 células por grama de matéria fresca (Tabela 2). Esses resultados foram superiores aos encontrados por Santos (2008), que observou densidade igual a 10^4 células por grama de matéria fresca, em trabalho realizado com bactérias diazotróficas associadas a fruteiras tropicais. Resultados diferentes foram descritos em outros trabalhos com plantas não-leguminosas, tais como, banana e abacaxi (Mia et al. 2010), arroz silvestre (Fernandes-Júnior et al. 2013), arroz comercial (Rangjaroen et al. 2015), cana-de-açúcar (Milani et al. 2011; Beneduzi et al. 2013; Rodrigues et al. 2016b; Leite et al. 2018a), mandioca (Leite et al. 2018b), gramíneas forrageiras (Souza et al. 2017), os quais encontraram organismos diazotróficos em todas as partes amostradas.

O maior número de isolados no solo rizosférico é devido ao fato desse micro-ambiente ser a região do solo influenciada pela rizodeposição de exsudados (compostos orgânicos como flavonoides e ácidos orgânicos) mucilagem e células em degradação (Turner et al. 2013). Desse modo, a combinação desses compostos liberados pelas raízes torna o solo rizosférico um local atrativo para micro-organismos, onde há complexa atividade bioquímica (Brahmaprakash et al. 2017). Na literatura há relatos que corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, onde bactérias diazotróficas foram encontradas em maior número no solo rizosférico e em raízes de diferentes espécies vegetais, e não da parte aérea (Diniz et al. 2012; Gaviria-Giraldo et al. 2018; Leite et al.

2018a; Leite et al. 2018b; Santos et al. 2014). No entanto, o número de isolados provenientes desse ambiente nesses estudos foram menores se comparados aos nossos.

Em relação ao caráter diazotrófico, somente bactérias que crescem no meio NFb apresentaram essa característica, sugerindo que esses micro-organismos possam pertencer ao gênero *Azospirillum* sp. Em relação às análises em meio semissólido LGI, não foi possível identificar nenhum isolado com características semelhantes à espécie *Nitrospirillum amazonense* (anteriormente *Azospirillum amazonense*), mesmo que este meio de cultivo tenha indicado a ocorrência destas para folhas, raízes e solo rizosférico de *J. corumbensis*. Os nossos resultados corroboram com os resultados obtidos por Santos et al. (2015), que não observaram isolados similares à espécie *Azospirillum amazonense* (atual *Nitrospirillum amazonense*) em raízes e brotos de milho. Entretanto, os autores sugerem que as bactérias não foram isoladas devido à perda da viabilidade bacteriana ou pelo fato do meio de cultura LGI recomendado exclusivamente para o isolamento de bactérias desta espécie não ter possibilitado a detecção das mesmas, visto que este meio de cultura é considerado semi-específico (Santos et al. 2015). Segundo Baldani et al. (2014), bactérias não fixadoras de N_2 (sequestrantes) podem crescer juntamente com os diazotróficos durante o período de incubação (formação da película) devido ao nitrogênio fixado liberado pelas bactérias diazotróficas, e estas podem interferir no processo de isolamento e purificação das bactérias alvo (diazotróficas).

4.5.2 Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados

As análises das características morfológicas mostraram que existe variabilidade fenotípica dos isolados bacterianos obtidos neste estudo, sendo observada a formação de sete grupos com 70% de similaridade no dendrograma, corroborando com os resultados encontrados por Silva e Melloni (2011), que, ao caracterizarem bactérias de solos de reserva biológica, obtiveram alta variabilidade fenotípica dos isolados bacterianos.

Diferentes resultados foram encontrados por Santos (2008) ao caracterizar bactérias diazotróficas isoladas de frutíferas tropicais (goiaba, maracujá, abacaxi e mamão), obtendo a formação de sete grandes grupos com 90% de similaridade.

Os estudos de caracterização de bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas indicam que a maioria dos isolados bacterianos são provenientes de tecidos internos de raízes (Videira et al. 2009). No entanto, em nosso estudo a maioria dos isolados bacterianos caracterizados foi proveniente do solo rizosférico. Neste contexto, o conhecimento da diversidade fenotípica das bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de plantas de *J. corumbensis* pode ajudar a compreender as variações que ocorrem na interação planta-bactéria. Dessa forma, a diversidade fenotípica pode assegurar não só a resiliência de processos mediados em determinados ecossistemas, como também a ocorrência destes nos mais diferentes hábitats terrestres (Moreira e Siqueira 2006). Além disso, o conhecimento da população bacteriana nativa, bem como sua caracterização e identificação, é necessário para entender a distribuição e a diversidade de bactérias nativas na rizosfera de culturas específicas (Chahboune et al. 2011).

Neste estudo, verificamos que 36% dos isolados foram capazes de produzir ácido indolacético *in vitro*, em meio suplementado com L-triptofano, corroborando com os relatos de Souza et al. (2015) de que a síntese de compostos indólicos (dentre eles o AIA) por bactérias ocorre através de vias alternativas que dependem da presença de precursores, sendo o principal deles o L-triptofano. Além disso, os isolados são provenientes do solo rizosférico ou rizosfera e conforme descrito por Sahasrabudhe (2011), a capacidade de produção de fitohormônios está distribuída amplamente entre micro-organismos do solo, onde cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera de plantas são produtoras de AIA.

Deste modo, o desempenho de bactérias nos ensaios de verificação e quantificação *in vitro* da produção de AIA (em meio de cultivo com a adição do L-triptofano) neste estudo mostrou-se satisfatório. Resultados semelhantes foram reportados por Araujo et al. (2012) que obtiveram 45 isolados da rizosfera de *Brachiaria brizantha*, dos quais sete foram selecionados para teste de promoção de crescimento, bem como produção de ácido indolacético, no qual os valores de síntese desse fitohormônio variaram entre 7,04 a 18,9 μg/mL, com destaque para os isolados 1A e 3A, com 18,9 e 17,2 μg/mL, respectivamente. Nossos resultados também corroboram com os resultados obtidos no trabalho com bactérias diazotróficas associadas ao sisal (*Agave sisalana Perrine ex Engelm*) por Santos et al. (2014), onde todos os isolados foram capazes de produzir esse fitohormônio na presença de triptofano, com concentrações variando entre 5,15 a 25 μg/mL. Porém, diferentes resultados foram encontrados no trabalho realizado por Islam et al. (2016) com isolados do solo rizosférico de pepino, onde as concentrações de produção de AIA variaram entre 26,78 a 51,28 μg/mL, sendo maiores em relação às concentrações descritas neste estudo. No trabalho realizado por Pontes et al. (2015), 74% dos isolados bacterianos associados a plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) foram capazes de produzir compostos indólicos em meio suplementado com triptofano, as concentrações variaram entre 0,1 a 100 μg/mL. Outros estudos também revelaram maiores produções de compostos indólicos na presença de triptofano por bactérias associadas às plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.) (Ambrosini et al. 2012), arroz (Costa et al. 2013), cana-de-açúcar (Beneduzi et al. 2013), frutíferas (Rodrigues 2016a) e gramíneas forrageiras (Souza et al. 2017). Portanto, os isolados bacterianos produtores de AIA descritos neste estudo possivelmente podem promover o crescimento vegetal, uma vez que esse fitohormônio atua no alongamento das raízes e permite maior absorção de água e nutrientes (Arruda et al. 2013).

A capacidade de solubilização de fosfatos que bactérias promotoras de crescimento exibem é um importante mecanismo, pois convertem o fosfato insolúvel em fosfatos solúveis e biodisponibilizam para as plantas (Busato et al. 2012). Neste estudo, descobrimos que os isolados testados não foram capazes de solubilizar fosfato de alumínio, no entanto, houve uma baixa ocorrência de isolados que foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro*, com índice de solubilização considerado baixo (IS<2), variando entre 1,37 a 1,87 mm, com destaque para o isolado 48A, com índice enzimático igual a 1,87 mm. De acordo com Matos et al. (2017), o processo de solubilização pode ser afetado pela composição do meio de cultura, bem como o aumento do uso de fontes de nitrogênio (como os nitratos) e também pelo uso de altas concentrações de açúcares (como a glicose), que podem ocasionar variações no diâmetro dos halos de solubilização ou mesmo impedir o desenvolvimento dos isolados no meio de cultivo. Segundo Mendes et al. (2014) o fosfato de alumínio é uma forma menos reativa que o fosfato de cálcio e, conforme descrito por Illmer et al. (1995), os micro-organismos produzem ácidos orgânicos que, somados à liberação de íons de H^+, conferem a estes habilidades para solubilizarem fosfato de alumínio. Porém, este tipo de fosfato, quando liberado no meio (em sua forma monomérica Al^{+3}), pode ser tóxico aos isolados, o que pode explicar a não detecção do crescimento e nem a atividade solubilizadora dos isolados nesse estudo.

Os autores Illmer et al. (1995) ainda ressaltam que o fósforo proveniente da solubilização é capaz de anular o efeito tóxico do alumínio. Porém, conforme reportado por Chagas Junior et al. (2010) a produção de ácidos orgânicos não é o único mecanismo de solubilização de fosfatos, já que parte dos isolados que avaliaram em seu estudo alcalinizaram o meio ou não alteraram o pH. No trabalho realizado por Massenssini et al. (2015) com potencial de solubilização da microbiota rizosférica de eucalipto, a adição de

fosfato de alumínio não foi capaz de estimular a atividade solubilizadora dos micro-organismos, sugerindo que o potencial de solubilização varia devido às características químicas das diferentes fontes de fósforo. Diferentes resultados foram encontrados por Chagas Junior et al. (2010) em trabalho com capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios, onde cerca de 33,2% dos isolados bacterianos apresentaram solubilização de fosfato de cálcio, enquanto que 22,9% apresentaram solubilização de fosfato de alumínio. No trabalho de Santos et al. (2014) com bactérias associadas ao sisal, nenhum dos isolados apresentou halo característico quanto à capacidade para solubilização de fosfato de cálcio. No estudo de Matos et al. (2017) com potencial de solubilização de bactérias isoladas de bananeiras, foi reportado que cerca de 67,5% dos isolados testados solubilizaram fosfato em meio sólido suplementado com fosfato tricálcio e alguns deles foram considerados como solubilizadores de alta eficiência. Sungthongwises (2016), em trabalho com isolados de mandioca, observou que estes apresentaram capacidade para solubilização do fosfato de alumínio, porém, nenhum dos isolados apresentou habilidade para solubilização de fosfato de cálcio. Em estudo de Silva e Vidor (2000), foi descrita a baixa ocorrência de micro-organismos capazes de solubilizar os dois tipos de fosfatos. Os autores explicam que a baixa solubilização de fosfato de alumínio pode estar relacionada ao fato dos micro-organismos serem obtidos primeiro em meio de cultivo contendo fosfato de cálcio para posteriormente serem avaliados na presença de fosfato de alumínio. Assim, essa sequência no processo de avaliação dos micro-organismos poderia causar maior seletividade de isolados com capacidade para solubilização de cálcio em detrimento do fosfato de alumínio.

Nossos resultados corroboram com outros estudos que descrevem a baixa ocorrência de isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato de cálcio tais como em *Brachiaria brizantha* (Araujo et al. 2012), mandioca (Leite et al. 2018b), trigo (Suleman

et al. 2018), mamão (Rodrigues et al. 2016a), abacaxi (Baldotto et al. 2014), cevada (Pontes et al. 2015) e girassol (Ambrosini et al. 2012). Portanto, os estudos com as diferentes fontes inorgânicas de fosfato de baixa solubilidade (fosfatos de alumínio, cálcio, tricálcio e ferro) e de outras fontes orgânicas de fosfatos, ajudam a compreender os mecanismos desempenhados pelos micro-organismos *in vitro* ou *in situ*, bem como a selecionar os mais promissores em ambas condições (Bashan et al. 2013).

A mineralização do fósforo orgânico é um processo mediado por enzimas conhecidas como fosfatases (Nahas 2002; Matos et al. 2017). De acordo com Bashan et al. (2013), estas enzimas atuam na dissolução enzimática dos fosfatos orgânicos, pois são liberadas no meio extracelular e, assim, catalisam a hidrólise desses compostos e produzem o fósforo solúvel. Neste estudo, detectamos a atividade da fosfatase ácida e alcalina em 24% e 22% dos isolados testados, respectivamente e com índice enzimático considerado moderado (2,1-3 cm) para a maioria dos isolados, com exceção dos isolados 4B, 16C e 126, que apresentaram índice enzimático considerado alto (3,1-4 cm) para atividade fosfatase ácida e para os isolados 8IA, com índice enzimático alto (3,1-4cm) e 4B, com índice enzimático superior (>5,1 cm) para atividade fosfatase alcalina. Resultados diferentes foram encontrados por Nahas (2002), que reportou um número maior de isolados com atividades das fosfatases ácida (40,6%) e alcalina (28,4%), porém, o índice enzimático foi distribuído entre cinco faixas para ambas as atividades, onde a maioria dos isolados bacterianos testados apresentou atividades (fosfatase e alcalina) com índice enzimático considerado baixo. No estudo de Matos et al. (2017) também foi descrito um número superior de isolados que apresentaram atividade fosfatase ácida, no entanto, a maioria dos isolados teve índice enzimático com até 1 cm de diâmetro, sendo inferiores aos nossos resultados (com índice acima de 1 cm). Portanto, a detecção das atividades fosfatases sugere que os isolados bacterianos obtidos neste estudo podem

realizar processos como complexação do metal e dissolução enzimática do fosfato orgânico.

O amido é a reserva mais importante em se tratando de armazenamento de energia, pois é um composto orgânico (que compõe a massa vegetal e a massa animal) formado por amilose e amilopectina, podendo ser degradado por bactérias e fungos através da atividade amilolítica (Alariya et al. 2013, Van der Sand et al. 2014). Neste estudo constatamos a atividade amilolítica em 66% dos isolados bacterianos, com a maioria apresentando índice enzimático considerado alto, com destaque para os isolados 8ID, 16A, 20A, 50B e 50C, que tiveram IE>4, sendo superiores em relação aos demais isolados. Apenas o isolado 128 apresentou índice enzimático considerado baixo (IE<2). Resultados diferentes foram encontrados por Krishnan et al. (2012) em trabalho com bactérias isoladas de mamão, onde detectaram a atividade amilolítica em apenas quatro isolados bacterianos, porém sendo inferior aos nossos índices. Nunes et al. (2018), em trabalho com bactérias isoladas de leguminosas forrageiras, reportaram que todos os isolados testados foram capazes de crescer em meio suplementado com amido, no entanto, apenas três isolados apresentaram atividade amilolítica, com índice enzimático considerado baixo (IE<2). No trabalho de Ramos et al. (2018), com bactérias do solo rizosférico e não rizosférico da cultura de milho, foram observados que cerca de 20,7% e 57,9% dos isolados, respectivamente, produziram halo de hidrólise do amido. Portanto, os nossos resultados sugerem que a maior porcentagem dos isolados que apresentaram a atividade amilolítica pode exercer maior habilidade no consumo de amido como fonte de carbono e energia, refletindo na sua importância ecológica para ciclagem de nutrientes no solo.

4.5.3 Análise da variabilidade genética por meio de BOX PCR

Os resultados obtidos pela técnica do BOX A1R-PCR neste trabalho mostraram que existe alta variabilidade genética entre as bactérias diazotróficas isoladas de *J. corumbensis*, sendo observada a formação de sete grupos com no máximo 77% de similaridade, onde os perfis de bandas obtidos apresentaram 78,26% de polimorfismo e 21,74% de monomorfismo, corroborando com os resultados encontrados por Santos et al. (2014), que obtiveram padrões de bandas distintos para a maioria das bactérias diazotróficas isoladas de sisal pela técnica do BOX A1R-PCR. Chueire et al. (2000) e Freitas et al. (2007), destacam que o uso desse oligonucleotídeo específico permite a detecção de bandas polimórficas suficientes para análise de variabilidade genética de bactérias. No entanto, os autores também sugerem que existe a necessidade do uso de marcadores genotípicos conjuntamente com características morfológicas, para gerar dados mais completos relacionados à identificação e seleção de isolados bacterianos, bem como sua diversidade, dentro de uma abordagem polifásica. Desse modo, em nosso estudo foi constatado que o método do BOX A1R-PCR foi eficiente para analisar e separar os isolados bacterianos que estavam próximos fenotipicamente.

Assim, este é o primeiro estudo de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas à *J. corumbensis* para o Estado de Mato Grosso do Sul. Aqui, reportamos que houve maior ocorrência e isolamento de bactérias diazotróficas provenientes do solo rizosférico. Estes micro-organismos apresentam grande variabilidade fenotípica e genotípica e possivelmente apresentam habilidades para promoção de crescimento vegetal, com destaque para os isolados 2A, 8IA, 10A, 16C, 21A, 36B, 46C, 47A, 51A, 51B e 53D, que foram considerados como mais promissores por apresentarem mais de uma característica para promoção de crescimento de plantas *in vitro*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela concessão da bolsa de estudos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto.

4.6 Referências bibliográficas

Aguiar LF, Almeida CA, Camargos LS (2012) A Caracterização bioquímica da composição do cerne de Jaracatiá (*Jaracatia spinosa*). Act Igu 1:65-71.

Alariya SS, Sethi S, Gupta S, Gupta BL (2013) Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. Arch Appl Sci Res 5:15-24.

Ambrosini A, Beneduzi A, Stefanski T, et al (2012) Screening of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuu*s L.). Plant Soil 356:245-264. doi: 10.1007/s11104-011-1079-1.

Araujo FF, Guaberto LM, Silva IF (2012) Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. Rev Bras Zootec. doi: 10.1590/S1516-35982012000300007.

Arruda L, Beneduzi A, Martins A, et al (2013) Screening of rhizobacteria isolated from maize (Zea mays L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. Appl Soil Ecol. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.09.001.

Baldani JI, Reis VM, Videira SS, et al (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. Plant Soil. doi: 10.1007/s11104-014-2186-6.

Baldotto LEB, Baldotto MA, Olivares FL, Souza AN (2014) Performance of pineapple

slips inoculated with diazotrophic phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. Rev Ceres. doi: 10.1590/S0034-737X2014000300017.

Bashan YB, de-Bashan LE (2010) How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. Adv Agron 108:77-136. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8.

Bashan Y, Kamnev AA, De-Bashan LE (2013) A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. Biol Fertil Soils. doi: 10.1007/s00374-012-0756-4.

Bashan YB, de-Bashan LE, Prabhu S, Hernandez J-P (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations e practical perspectives (1998-2013). Plant Soil, 378:1-33.

Bednarczuk VO, Verdam MCS, Miguel MD, Miguel OG (2010) Tests *in vitro e in vivo* used in the toxicological screening of natural products. Vis Acad. Curitiba 11:43-50.

Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, Vargas LK, Lisboa BB, Favreto R, Passaglia LMP (2013) Diversity e plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. Appl Soil Ecol, 63:94-104. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.08.010.

Berraquero FR, Baya AM, Cormenzana AR (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. Acta Pharm 17:399-406.

Brahmaprakash GP, Sahu PK, Lavanya G, Nair SS, Gangaraddi VK. Gupta A (2017) Microbial functions of the rhizosphere. In: Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives. Springer, Singapore pp 177-210.

Busato JG, Lima LS, Aguiar NO, et al (2012) Changes in labile phosphorus forms during

maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. Bioresour Technol. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.126.

Carvalho NL, Zabot V (2012) Nitrogênio: nutriente ou poluente. Rev Eletrônica Gest Educ Tecnol Ambient (e-ISSN: 2236-1170) 6:960-974.

Cavalcanti NB, Resende GM, Brito LTL (2009) Efeito de diferentes substratos no crescimento do mamãozinho-de-veado. Eng Amb 6:434-446.

Chagas Junior AF, Oliveira LA, Oliveira AN, Willerding AL (2010) Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. Acta Sci - Agron 32:359–366. doi: 10.4025/actasciagron.v32i2.3185.

Chahboune R, Barrijal S, Moreno S, Bedmar EJ (2011) Characterization of Bradyrhizobium species isolated from root nodules of *Cytisus villosus* grown in Morocco. Syst appl Microbiol 34:440-445. doi: 10.1016/j.syapm.2011.04.008.

Chueire LMO, Nishi CYM, Loureiro MF, Hungria M (2000) Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnicade PCR com "primers" aleatórios ou específicos. Agri Trop 4:80-95.

Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biol Biochem, 42: 669-678.

Costa PB, Beneduzi A, Souza R, et al (2013) The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: Guidelines for directed bacterial prospection and testing. Plant .Soil 368:267–280. doi: 10.1007/s11104-012-1513-z

Damasceno GA, Souza PR (2010) Sabores do Cerrado e Pantanal. Editora UFMS, Campo Grande-MS.

Diniz PFA, Oliveira LEM, Lopes NA, Florentino LA, Carvalho TS, Moreira FMS (2012) Bactérias diazotróficas em solos sob seringueira. Rev Bras Cien Solo. doi: 10.1590/S0100-06832012000500006.

Döbereiner J, Baldani VLD, Baldini JI (1995) Como Isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-SPI, Brasília-DF, Embrapa-CNPAB, Itaguaí- RJ.

Fachinello JC, Nachtigal JC, Kersten E (2008) Fruticultura: fundamentos e práticas. Pelotas.

Ferreira DF (2014) Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. In Ciência 38:109-112.

Fernandes-Júnior PI, Duarte PGM, Perin L, Silva LM, Baraúna AC, Alves FM, Zilli JE (2013) Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. Rev Biol Trop 61:991-999. doi: 10.15517/rbt.v61i2.11238

Freitas ADS, Vieira CL, Santos CERS, Stamford NP, Lyra MCCP (2007) Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. Bragantia 66:497-504. doi: 10.1590/S0006-87052007000300017

Fukami J, Nogueira MA, Araujo RS, Hungria M (2016) Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. AMB Express 6:1. doi: 10.1186/s13568-015-0171-y.

Fukami J, Cerezini P, Hungria M (2018). *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. AMB Express 8:73. doi: 10.1186/s13568-018-0608-1.

Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (2004) Taxonomic outline of the procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Michigan State University.

Gaviria-Giraldo J, Restrepo-Franco GM, Galeano-Vanegas NF, Hernández-Rodríguez A (2018) Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L. Rev Cien Agri 15:19-27. doi: 10.19053/01228420.v15.n1.2018.7753.

Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Sci. doi: 10.6064/2012/963401

Hammer Ø, Harper D, Ryan P (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontol Electron 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Hassler M (2019) World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version Nov 2018). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist (Roskov Y, Ower G, Orrell T, Nicolson D, Bailly N, Kirk PM, Bourgoin T, DeWalt RE., Decock W., Nieukerken EV, Zarucchi J, Penev L., eds.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X. http://www.catalogueoflife.org/col/details/database/id/141. Acesso em: 27 Maio 2019.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant Soil 331:413-425.

Hungria M (2011) Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Documentos, 325. Embrapa Soja, Londrina.

https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29676/1/Inoculacao-com-*Azospirillum*.pdf . Acesso em: 28 Maio 2019.

Illmer P, Barbato A, Schinner F (1995) Solubilization of hardly-soluble AlPO4 with P-solubilizing microorganisms. Soil Biol Biochem. doi: 10.1016/0038-0717(94)00205-F.

Kinupp VF (2007) Plantas Alimentícias não convencionais da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Krishnan P, Bhat R, Kush A, Ravikumar P (2012) Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from Carica papaya fruits. J Appl Microbiol 113:308–317. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05340.x.

Leff E (2002) Agroecologia e saber ambiental. In: Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável. Porto Alegre, pp 36-51.

Leite M, Pereira A, Souza A, et al (2018a) Potentially Diazotrophic Endophytic Bacteria Associated to Sugarcane are Effective in Plant Growth-promotion. J Exp Agric Int. doi: 10.9734/jeai/2018/39963.

Leite MCBS, Pereira APA, Souza AJ, Andreote FD, Freire FJ, Sobral JK (2018b) Bioprospection and genetic diversity of endophytic bacteria associated with cassava plant. Rev Caatinga. doi: 10.1590/1983-21252018v31n207rc.

Lima LR, Pirani JR (2002) Caricaceae. In: Wanderley MGL; Shepherd GJ; Giulietti AM; Melhem TS; Bittrich V; Kameyama C (eds) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 79-82.

Lorenzi H (2002) Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa-SP.

Massenssini AM, Tótola MR, Borges AC, Costa MD (2015) Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de eucalipto cultivado em topossequência típica da zona da mata mineira. Rev Bras Cienc Solo. doi: 10.1590/01000683rbcs20140339.

Matos ADM, Gomes ICP, Nietsche S, et al (2017) Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. An Acad Bras Cienc. doi: 10.1590/0001-3765201720160111.

Mendes GO, Freitas ALM, Pereira OL, et al (2014) Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Ann Microbiol. doi: 10.1007/s13213-013-0656-3.

Mia MAB, Shamsuddin ZH, Mahmood M (2010) Use of Plant Grouth Promoting Bacteria in Banana: A new insight for sustainable Banana Production. Int J Agr Biol 12:459-467.

Milani KML, Machineski O, Balota EL (2011) Ocorrência e isolamento de bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar. Enciclopédia Biosf Cent Científico Conhecer- Goiânia 7:1345-1351.

Moraes LFD, Assumpção JM, Luchiari C, Pereira TS (2006) Plantio de espécies arbóreas nativas para a restauração ecológica na reserva biológica de Poço das Antas. Rod 57:477-489. doi: 10.1590/2175-7860200657307

Moreira FMS, Siqueira JO (2006) Microbiologia e bioquímica do solo. 2a ed. UFLA, Lavras, Brasil.

Moreira FMS, Silva K, Nóbrega RSA, Carvalho F (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. Comun Sci 1:74-99

Nahas E, Centurion J, Assis L (1994) Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. Rev Bras Ciênc Solo 18:43-48.

Nahas E (2002) Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. Bragantia. doi: 10.1590/S0006-87052002000300008.

Nunes GF de O, Menezes KAS, Sampaio AA, et al (2018) Polyphasic characterization of forage legumes root nodule bacteria isolated from semiarid region in Brazil. Rev Ciênc Agra 41:612–624. doi: 10.19084/rca17339.

Oliveira AN de, Oliveira LA de, Andrade JS, Chagas-Júnior AF (2007) Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. Ciência e Tecnol Aliment. doi: 10.1590/s0101-20612007000100011.

Pereg L, de-Bashan LE, Bashan Y (2016) Assessment of affinity e specificity of *Azospirillum* for plants. Plant Soil 399:389-414. doi: 10.1007/s11104-015-2778-9

Pontes AP, Souza R, Granada CE, Passaglia LMP (2015) Screening of plant growth promoting bacteria associated with barley plants (*Hordeum vulgare* L.) cultivated in South Brazil. Biota Neotrop 15(2): e20140105. doi: 10.1590/1676-06032015010514.

Pott A, Pott VJ (1994) Plantas do Pantanal. Embrapa Pantanal, Corumbá-MS.

Ramos RF, Sobucki L, Rohrig B, et al (2018) Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. Rev Ciênc Agrovet 17:417-427. doi: 10.5965/223811711732018417.

Rangjaroen C, Rerkasem B, Teaumroong N, et al (2015) Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice landraces. Ann Microbiol 65(1):253-266. doi: 10.1007/s13213-014-0857-4.

Reis FB, Silva MF, Tekeira KRS, et al (2004) Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de

cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. R Bras Ci Solo 28:103-113. doi: 10.1590/S0100-06832004000100011.

Rodrigues PSL (2016a) Caracterização molecular e de promoção de crescimento de plantas por bactérias diazotróficas associadas à frutíferas tropicais. Campos dos Goytacazes, Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.

Rodrigues AA, Forzani MV, Soares RS, Sibov ST, Vieira JDG (2016b) Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. Pesq Agropec Trop 46(2):149-158. doi: 10.1590/1983-40632016v4639526.

Sahasrabudhe MM (2011) Screening of rhizobia for indole acetic acid production. Ann Biol Res 2:460-468.

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A laboratory Manual. New York: Cold Spring: Cold Spring Harbor.

Santos ST (2008) Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Santos AFJ, Martins CYS, Santos PO, et al (2014) Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. Plant Soil 385:37-48. doi: 10.1007/s11104-014-2202-x.

Santos JS, Viana TO, Jesus CM, Baldani VLD, Ferreira JS (2015) Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. R Bras Ci Solo 39:78-85. doi: 10.1590/01000683rbcs20150725.

Sarwar M, Kremer RJ (1995) Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. Plant Soil 172(2):261-269. doi: 10.1007/BF00011328.

Silva Filho GN e Vidor C (2000) Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. R Bras Ci Solo 24:311-329.

Silva TF, Melloni R (2011) Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá (MG). R Bras Ci Solo 35:359-371. doi: 10.1590/S0100-0683201100020007.

Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genet Mol Biol 38(4):401-419. doi: 10.1590/S1415-475738420150053.

Souza MST, Baura VA, Santos SA, Fernandes- Júnior PI, Junior FBR, Marques MR, Paggi GM, Brasil MS (2017) *Azospirillum* spp. from native forage grasses in Brazilian Pantanal floodplain: biodiversity e plant growth promotion potential. World J Microbiol Biotechnol 33:81. doi: 10.1007/s11274-017-2251-4.

Suleman M, Yasmin S, Rasul M, et al (2018) Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. PLoS ONE 13(9):e0204408. doi: 10.1371/journal.pone.0204408.

Sungthongwises K (2016) Diversity of phosphate solubilizing bacteria under rubber intercropping. Asian J Plant Sci 15(3-4):75-80. doi: 10.3923/ajps.2016.75.80.

Sylvester-Bradley R, Asakawa N, Torraca SLA, Magalhães FMM, Oliveira LA, Pereira RM (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. Acta Amaz 12(1):15-22. doi: 10.1590/1809-43921982121015.

Turner TR, James EK, Poole PS (2013) The plant microbiome. Genome Biol 14(6):209.

Van Der Sand ST, Oliveira MT, Milagre LP, Minotto E (2014) Enzyme Characterization of Endophytic Actinobacteria. J Adv Sci Res 5:16-23.

Versalovic J, Scneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerpriting of

bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Mol Cell Biol 5:25-40.

Videira SS, Simões-Araújo JL, Rodrigues LS, Baldani VLD, Baldani JI (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* associated with rice plants grown in Brazil. FEMS Microbiol Lett 293:11-19.

Zar JH (2009) Biostatistical analysis. 5ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall.

5. Considerações finais

Neste estudo fornecemos uma visão prévia sobre a ocorrência de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas à *Jacaratia corumbensis*, bem como a sua variabilidade fenotípica e genotípica. Todos os isolados foram estocados e inseridos na coleção de micro-organismos pertencente ao Laboratório de Microbiologia da UFMS-*Campus* do Pantanal. Assim, os futuros estudos de promoção de crescimento em casa de vegetação, bem como a inoculação desses isolados bacterianos, poderão elucidar os mecanismos de interação com esta ou outras espécies nativas, principalmente com propósitos de incrementos da produtividade vegetal, além do potencial de uso econômico e sustentável no Estado de Mato Grosso do Sul.

ANEXOS

A Introdução geral apresentada nesta Dissertação está de acordo com o regulamento do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e seguiu as normas da Brazilian Journal of Botany (http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/IforA-BRJB+May+2019.pdf?SGWID=0-0-45-1606670-p174676984)

O artigo apresentado nesta Dissertação seguiu as normas da Revista Plant and Soil. (https://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/11104?detailsPage=pltci_3502646).