**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Isolamento, caracterização e seleção de bactérias associadas a *Acacia mangium* com potencial para promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urograndis*

Marcos Ferreira Teixeira

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2021**

Marcos Ferreira Teixeira
Engenheiro Agrônomo

Isolamento, caracterização e seleção de bactérias associadas a *Acacia mangium* com potencial para promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urograndis*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Prof.^a. Dr.^a: **Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Piracicaba
2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Teixeira, Marcos Ferreira

Isolamento, caracterização e seleção de bactérias associadas a *Acacia mangium* com potencial para promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urograndis* / Marcos Ferreira Teixeira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2021.

79 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Auxina 2. Inoculante 3. Miniestacas 4. Sequenciamento de Sanger 5. Rizosfera. I.Título.

Aos meus pais, Adelaide Teixeira e José Teixeira, pelo exemplo de força e perseverança, educação e caráter, e aos meus irmãos, Timóteo e Janete, pelo carinho e zelo, para sempre serei grato.

DEDICO

Às pessoas que sempre acreditaram em mim e sempre estiveram ao meu lado nessa jornada me incentivando, meu tio Josemil Peixoto, minha eterna orientadora Júlia Kuklinsky (*in memoriam*) e meus amigos Caio César e Yasmin Florentino.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adelaide e José Teixeira, e irmãos Timóteo e Janete, por todo carinho e zelo, com os quais posso contar sempre.

À minha família, exemplo de união e empatia, estão sempre presentes em minha vida e, com certeza, contribuíram muito para minha formação.

Ao meu tio Josemil Peixoto, que me dedica uma atenção mais que especial e está sempre me motivando, além do que, acima de tudo, confia e acredita no meu potencial.

A minha orientadora, prof^a Dr^a Elke Cardoso, pela paciência, dedicação e ensinamentos valiosos, os quais levarei para a vida.

Aos meus amigos de orientação e agregados, Antônio Marcos, Bruna Bacco, Filipe, Henrique Petry, Maiele Cintra e Eduardo, Victor Prudêncio e Allanna, pela parceria. Vocês são mais que amigos, tenho um apreço muito grande, saibam que os admiro.

À minha orientadora e tutora, prof^a. Dr^a Júlia Kuklinsky Sobral (*in memoriam*), maior incentivadora, e pessoa mais humana que já conheci, deixou muitos ensinamentos, sei que sua semente foi plantada em cada aluno que teve sob sua orientação.

Aos amigos do laboratório de microbiologia da ESALQ/USP, em especial ao prof. Dr. Arthur Prudêncio pelo pontapé inicial neste projeto e aos técnicos, Denise, Fernandinho e Sônia sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos e conterrâneos da Bela Vista 619, Adijailton, Bruno Cardillo, Felipe Martins, Jorge e Pedro Andrade, que sempre estão à disposição para ajudar.

À ESALQ e à equipe do DVATCOM, pela oportunidade de estar me especializando e poder contar com o apoio da moradia.

Aos amigos que a Vila Estudantil me proporcionou, Abimael, Antonio Neto, Brenda, Diana, Lucas, Mariana, Matheus, Rafael, Yajahaira, compartilhamos muitos momentos divertidos.

Aos amigos que o grupo PET e LGBM proporcionou e que de uma forma ou outra sempre dá um jeito de se reencontrar, Alyson, Anderson, Erivaldo, Everlaine, Jesimiel, João, Leandro, Lucianne, Maciel, Melquíades.

Ao meu amigo e parceiro de jornada, Caio César, seguimos desde a graduação nos mesmos passos, foi uma honra conviver com você por estes 7 anos.

A Yasmin e Shilton, essa dupla teimosa que briga por tudo, sempre estiveram perto, dando todo apoio, vou cultivar esta amizade para sempre.

MUITO OBRIGADO!

“A essência de um homem de verdade,
vem do pai pra formar um cidadão,
vem da mãe pra lhe dar educação,
e um menino vira homem de caráter.
Macho véi, com muita sinceridade,
Eu lhe digo que aqui no meu sertão,
caráter e honestidade são coisas de criação,
tem família que sofre com sede e fome,
sem dinheiro, sem luxo e sem “sobrenome”,
12 filhos e nenhum vira ladrão.”

Bráulio Bessa

SUMÁRIO

RESUMO	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Origem, características, importância econômica e ambiental da espécie <i>A. mangium</i>	15
2.2. Origem, características, importância econômica e ambiental de <i>Eucalyptus</i> sp.	16
2.3. A importância dos plantios consorciados de <i>A. mangium</i> e <i>Eucalyptus</i> sp.	17
2.4. A microbiota do solo como um recurso biotecnológico para a produção sustentável	18
2.5. Produção de Auxinas por bactérias e sua contribuição na promoção de crescimento de plantas.	19
2.6. Utilização de bactérias promotoras de crescimento na produção de mudas silvícolas.	20
3. HIPÓTESES.....	23
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo geral.....	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. MATERIAL e MÉTODOS	27
5.1. Descrição da área de coleta.....	27
5.2. Delineamento experimental da área de coleta.....	27
5.3. Estratégia de amostragem	28
5.4. Processamento das amostras, isolamento e contagem das unidades formadoras de colônia	29
5.5. Caracterização <i>in vitro</i> dos isolados quanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas e processo de preparação dos isolados para inoculação.....	30
5.5.1. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).....	31
5.5.2. Solubilização de Fosfato inorgânico de Cálcio bibásico (SF _i)	31
5.5.3. Produção de Exopolissacarídeos (EPS)	32
5.5.4. Produção de ácido indolacético (AIA).....	33
5.6. Seleção dos isolados com base na produção de AIA para o teste de promoção de crescimento em mudas de <i>E. urograndis</i>	34
5.7. Teste de promoção de crescimento em mudas de <i>E. urograndis</i> para selecionar os isolados para compor o consórcio bacteriano	34
5.8. Identificação molecular das bactérias isoladas do solo, da rizosfera e das raízes de <i>A. mangium</i>	36

5.8.1. Extração de DNA.....	36
5.8.2. Amplificação do rRNA ribossomal	37
5.8.3. Sequenciamento, classificação e construção do dendrograma	37
5.9. Avaliação da eficiência do consórcio bacteriano na promoção de crescimento de mudas de <i>E. urograndis</i>	38
5.10. Análise estatística dos dados	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1. Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)	41
6.3. Seleção dos isolados para o teste de promoção de crescimento em mudas de <i>E. urograndis</i> 48	
6.4. Caracterização molecular dos isolados selecionados	49
6.5. Teste de promoção de crescimento em mudas de <i>E. urograndis</i> para selecionar os isolados para compor o consórcio bacteriano.	50
6.6. Avaliação da eficiência do consórcio bacteriano na promoção de crescimento de mudas de <i>E. urograndis</i>	55
7. CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	77

RESUMO

Isolamento, caracterização e seleção de bactérias associadas a *Acacia mangium* com potencial para promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urograndis*

A silvicultura brasileira tem recebido grande destaque no ranque mundial por sua alta produtividade. Um ponto chave no setor florestal é a produção de mudas e o uso de micro-organismos nessa etapa proporciona ganhos, pois estes possuem capacidade de promover o crescimento em mudas e o mecanismo chave é a produção de fitohormônios, como o ácido indol-acético (AIA). O AIA atua na divisão celular e na formação de raízes adventícias. Foi observado que, em plantações mistas de *Eucalyptus urograndis* e *Acacia mangium*, o primeiro foi colonizado principalmente por uma microbiota funcional que era predominante na segunda, quando ambos cresciam em monocultura. Diante dessas características, levantou-se a hipótese de que a *A. mangium* abriga bactérias promotoras de crescimento de plantas com potencial de promover o crescimento também em mudas de *Eucalyptus urograndis*. O consórcio bacteriano de isolados obtidos de solo rizosférico, não rizosférico e endofíticos da raiz, associados a *A. mangium*, após isolamento e seleção poderão representar um grande potencial de crescimento se inoculado em mudas de *E. urograndis*. Com este trabalho objetiva-se, pois, realizar esta pesquisa fisiológica, a fim de verificar seu efeito no *Eucalyptus urograndis*, isoladamente ou em consórcio. Para atingir este objetivo foi realizado o isolamento de bactérias dos diferentes locais de plantas saudáveis de *A. mangium*, cultivadas na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga (ESALQ-USP), num Latossolo Amarelo, tipicamente distrófico, de textura médio-arenosa. A seleção dos isolados para a formação do consórcio foi feita por meio da aplicação de testes de promoção de crescimento vegetal *in vitro* e testes de enraizamento de mudas de *E. urograndis* em casa de vegetação, para seleção do(s) isolado(s) de cada ambiente para formação do consórcio bacteriano. Foi observado que todos isolados foram capazes de produzir AIA e o ambiente endofítico, seguido do ambiente rizosférico teve maior frequência relativa de bactérias com potencial de promover o crescimento em plantas. O teste de enraizamento foi uma ferramenta eficiente para seleção dos isolados para formação do consórcio bacteriano. Os tratamentos inoculados apresentaram área superficial foliar superior a 70 cm², enquanto os tratamentos sem inóculo não atingiram 70 cm², evidenciando uma tendência de promoção de crescimento vegetal. Verificou-se que a bactéria *Pseudomonas* endofítica de raiz, mais eficiente na promoção de crescimento de mudas de *E. urograndis*, mostrando potencial para uso em programas de produção de mudas de *E. urograndis*. O consórcio bacteriano foi capaz de suprir a nutrição adequada mesmo em plantas que receberam apenas 50% da adubação recomendada. Conclui-se assim que *A. mangium* possui bactérias capazes de promover crescimento em mudas de *E. urograndis* e o consórcio bacteriano foi eficiente na promoção de crescimento dessa planta.

Palavras-chave: Auxina; Inoculante ; Miniestacas ;Sequenciamento de Sanger; Rizosfera.

ABSTRACT

Isolation, characterization and selection of bacteria associated with *Acacia mangium* with potential to promote growth in *Eucalyptus urograndis* seedlings

Brazilian forestry has received great prominence in the world ranking for its high productivity. A key point in the forestry sector is the production of seedlings and the use of microorganisms at this stage provides gains, as they have the capacity to promote growth in seedlings and the key mechanism is the production of phytohormones, such as indole-acetic acid (AIA), a technique that has been promising. AIA increases cell divisions in the plant tissue and promotes the formation of adventitious roots. It was observed that *Acacia mangium* was capable of recruiting a functional microbiota; therefore we raised the hypothesis that *A. mangium* harbors plant growth-promoting bacteria with the potential to promote growth in *Eucalyptus urograndis* seedlings. We obtained a bacterial consortium of isolates from rhizospheric soil, non-rhizospheric soil and root endophytes of *A. mangium*, and used it, after selection in vitro, to inoculate *E. urograndis* seedlings. The objective of this work is to isolate, select and physiologically characterize plant growth promoting bacteria associated with *A. mangium* and to evaluate their biotechnological potential in promoting seedling growth of *E. urograndis*, alone or in consortium. The *Acacia* plants were grown at the Experimental Forest Science Station of Itatinga (ESALQ-USP) in a “Latossolo Amarelo, tipicamente distrófico”, with a medium-sandy texture. The selection of isolates for the formation of the consortium took place through the application of in vitro tests to find out if they produce plant hormones or show other characteristics which make them candidates for rooting tests in *E. urograndis* seedlings in a greenhouse. We found that all isolates were able to produce AIA and the endophytic environment, followed by the rhizospheric environment had a higher relative frequency of bacteria with the potential to promote growth in plants. The rooting test was an efficient tool for selecting the isolates to form the bacterial consortium. The inoculated treatments showed leaf surface area greater than 70 cm², while treatments without inoculum did not reach 70 cm², showing a tendency to promote plant growth. It was found that the root endophytic *Pseudomonas* bacterium, more efficient in promoting the growth of *E. urograndis* seedlings, showing potential for use in *E. urograndis* seedling production programs. We conclude that *A. mangium* plants furnished bacteria capable of promoting growth in *E. urograndis* seedlings and the bacterial consortium is efficient in promoting plant growth.

Keywords: Auxine; Inoculant; Mini-cuttings; Sanger sequencing; Rhizosphere.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos tratamentos para avaliação do desempenho do isolados utilizado em consórcio ou não, considerando a adubação completa (100%) ou reduzida (50%) e na presença ou ausência de autoclavagem do substrato.	39
Tabela 2: Característica de promoção de crescimento de plantas <i>in vitro</i> dos isolados do solo não rizosférico (S) cultivado com <i>A. mangium</i>	42
Tabela 3: Característica de promoção de crescimento plantas <i>in vitro</i> dos isolados do solo rizosférico (R) cultivado com <i>A. mangium</i>	44
Tabela 4: Característica de promoção de crescimento de plantas <i>in vitro</i> dos isolados endofíticos das raízes (E) obtido de <i>A. mangium</i>	46
Tabela 5: Classificação taxonômica através do sequenciamento do 16S rRNA dos 10 isolados selecionados de cada ambiente, solo não rizosférico (S), solo rizosférico (R) e endofítico de raiz (E), devido à maior produção de AIA.	49
Tabela 6: Contribuição individual do resíduo da análise de componentes principais (ACP). 51	
Tabela 7: Contribuição das variáveis analisadas na análise de componentes principais (ACP).	52
Tabela 8: Correlação de Pearson entre as variáveis analisadas na análise de componentes principais (ACP).	52
Tabela 9: Parâmetros avaliados no teste de promoção de crescimento de mudas de <i>E. urograndis</i> submetidas a inoculação com diferentes isolados bacterianos oriundos do solo não rizosférico (S), do solo rizosférico (R) e endofíticos de raiz (E).	53
Tabela 10: Efeito da inoculação dos nas mudas de <i>E. urograndis</i>	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental selecionado para amostragem de solo não rizosférico e rizosférico e raízes. No lado esquerdo, mostra-se em cor preta o tratamento utilizado para coleta (T6), distribuído em três diferentes blocos utilizados para coleta, enquanto na parte sem inscrições estão os demais tratamentos que compõe o experimento. No lado direito, em cores, observa-se a composição detalhada do tratamento utilizado para coleta.....	28
Figura 2: Representação de coleta dos pontos amostrais ao redor das plantas de <i>A. mangium</i>	28
Figura 3: Meio semissólido NFb, para caracterização de fixadores biológicos de nitrogênio. A) ausência de fixação de nitrogênio, B) presença de fixação de nitrogênio.	31
Figura 4: Meio para caracterização de solubilizadores de fosfato inorgânico. A) Isolados solubilizadores, B) Isolados não solubilizadores.....	32
Figura 5: Meio para caracterização de produtores de EPS. A) Isolados não produtores de EPS, B) Isolados produtores de EPS.	33
Figura 6: Meio acrescido de L-triptofano após reação com reagente de Salkowski. A) Curva para calibração a partir de AIA sintético. B) AIA produzidos pelos isolados.....	34
Figura 7: Instalação e manutenção do teste de promoção de crescimento em miniestacas de <i>E. urograndis</i> com a inoculação dos isolados selecionados pela capacidade de sintetizar AIA. .	36
Figura 8: Número de unidades formadoras de colônias obtidas a partir do isolamento de bactérias do solo não rizosférico (S), do solo rizosférico (R) e endofíticas de raiz (E), das plantas de <i>Acacia mangium</i> . Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	41
Figura 9: Frequência relativa (%) da A) Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), B) Produção de Exopolissacarídeos (EPS), C) Solubilização de Fosfato inorgânico (SF _i) por isolados bacterianos do solo não rizosférico (S), do solo rizosférico (R) e endofíticas de raiz (E), de plantas de <i>A. mangium</i>	47
Figura 10: Diagramação da análise de componentes principais (ACP) obtida com o resultado do teste de promoção de crescimento das mudas de <i>E. urograndis</i> inoculadas com diferentes bactérias. A elipse vermelha compreende as bactérias selecionadas dos três ambientes para compor o consórcio bacteriano.....	53
Figura 11: Representação das imagens de raízes das mudas de <i>E. urograndis</i> , geradas pelo método Scanner, através do software WinRHIZO®.	55

Figura 12: Representação das imagens de folhas de (A e B) escaneadas, e raízes (C e D) das mudas de *E. urograndis*, geradas pelo método Scanner, através do software WinRHIZO®. . 56

Figura 13: Mudas de *E. urograndis* 80 dias após estaqueamento em tubetes. 57

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A agricultura moderna passa por uma constante remodelagem para atender o propósito de produção sustentável, promovendo um ambiente mais seguro para todos. Neste sentido, a busca por alternativas que buscam a diversidade em diversos sistemas de produção, associadas com a redução de insumos artificiais têm sido cada vez mais procuradas em virtude de uma economia que busca promover o uso mais sustentável de todos os recursos naturais (YARTE et al., 2020). Neste contexto, uma leguminosa arbórea tem ganhado destaque no Brasil com o uso em plantios mistos, a Acácia (*Acacia mangium*). De origem australiana, esta espécie apresenta plasticidade frente às características edáficas, adaptando-se a solos pobres e ácidos (CATIE, 1992) e é capaz de proporcionar a entrada de nitrogênio no sistema devido à sua associação com bactérias diazotróficas (responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio - FBN), promovendo menor competição e até mesmo redução de aplicação deste nutriente limitante ao desenvolvimento vegetal.

Dentre as espécies florestais de maior abrangência de cultivo no Brasil está o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), representando mais de 70% da área plantada. A popularidade e elevada aceitação desta espécie se deu devido à alta capacidade produtiva somada às características morfológicas da espécie, como fuste reto e sem ramificações, proporcionando redução em custos com formação da floresta. No entanto, o setor florestal ou silvícola ainda possui alguns gargalos durante o ciclo vegetal e é sabido que uma das etapas mais importantes na cadeia florestal é a produção de mudas, que é um momento fisiologicamente mais delicado no qual as mudas estão mais suscetíveis a estresses abióticos e bióticos. Assim, este setor está em constante procura por métodos que promovam a maior eficiência no processo, bem como maior rusticidade de mudas para garantir o sucesso de sua implantação (MAFIA et al., 2005).

Como alternativa para contornar o gargalo supracitado, têm-se utilizado inoculantes à base de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) para obtenção de mudas mais rústicas. As bactérias presentes nestes inoculantes podem promover ganhos às plantas de diversas formas, como por exemplo, produção de fitohormônios, como ácido indolacético (AIA) e assim promover ganhos em desenvolvimento radicular (LUCY; REED; GLICK, 2004; SHARON et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017), disponibilização de nutrientes como fósforo e nitrogênio (ZULUAGA et al., 2020) e supressão de patógenos (BERG et al., 2016), entre outros. Portanto, a aplicação de micro-organismos é uma alternativa ecológica capaz de proporcionar o uso racional de insumos, uma vez que pode reduzir ou até mesmo substituir alguns insumos sintéticos.

Com isso, a busca por micro-organismos eficientes se torna cada vez mais importante e estudos recentes tem mostrado o microbioma da *A. mangium* como fonte de uma microbiota bacteriana com potencial uso para o crescimento de outras plantas (PEREIRA et al., 2017, 2019, 2021). Nos últimos achados de Pereira et al. (2017, 2019, 2021) foi evidenciado que a *A. mangium* possui capacidade de recrutar uma microbiota funcional relacionada à ciclagem de nitrogênio e fósforo. Além disso, em sistemas de plantações mistas (de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*) os autores supracitados mostraram diferenças significativas na estrutura do microbioma bacteriano, sendo a *A. mangium* a principal moduladora do sistema em virtude de que a comunidade microbiana do sistema misto se mostrou mais similar à estrutura da comunidade bacteriana da *A. mangium* do que de *E. grandis* quando cultivados em monocultura. A partir dessa observação, surgiu o interesse de isolar, caracterizar e obter isolados bacterianos de sistemas consorciados com potencial de promoção de crescimento de mudas de *Eucalyptus urograndis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem, características, importância econômica e ambiental da espécie *A. mangium*.

A acácia é uma leguminosa de ocorrência natural em regiões tropicais quentes e úmidas localizadas na Austrália, Papua Nova Guiné e Indonésia (FOELKEL, 2012). Em seu hábitat natural, esta árvore pode atingir cerca de 25 a 30 m de altura e 90 cm de diâmetro à altura do peito. Apresenta, na maioria das vezes, fuste reto, com ramificações que começam acima da metade da altura total. Quando livres de competição, a forma da copa é globular, porém, em plantações onde o espaçamento é menor, apresenta-se cônica. É uma espécie pioneira e heliófita, e pode ser encontrada de forma dispersa às margens de cultivos de cana-de-açúcar e até mesmo em plantios florestais.

Esta espécie cresce tanto em locais secos quanto úmidos, no entanto seu desempenho é favorecido em clima úmido, com precipitações médias anuais que variam de 1.000 até 4.500 mm e temperaturas entre 12°C e 34°C. Na Austrália, a espécie ocorre com maior frequência em altitudes inferiores a 100 m, porém, algumas populações podem ocorrer em altitudes que vão de 450 até 720 m (COUNCIL, 1980). A acácia também apresenta plasticidade quanto às características edáficas, se adaptando a solos compactados, erodidos e degradados, em declividades acentuadas e em locais infestados com ervas daninhas. Tolerar solos com pH de até 3,5 e também altos teores de óxidos de ferro e alumínio. No entanto, em condições salinas seu desempenho não é satisfatório (CATIE, 1992).

Introduzida no Brasil, esta espécie ganhou grande expressão, devido à sua significativa capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas, alta produção de madeira, e potencial de FBN (TONINI et al., 2009). Com isso, essa leguminosa vem sendo usada em consórcio com eucalipto. A FBN proporcionada pela simbiose entre *A. mangium* e bactérias diazotróficas eleva o aporte de nitrogênio no solo, o qual pode ser transferido para as plantas de eucalipto, o que reduz a competição interespecífica pelo nitrogênio mineral (PAULA et al., 2015). No trabalho desenvolvido por Tchichelle et al. (2017), plantios mistos de *A. mangium* x *Eucalyptus* sp. proporcionaram um incremento de nitrogênio no solo quatro vezes maior que a aplicação de fertilizantes nitrogenados em cultivos solteiros de *Eucalyptus* sp.

Os benefícios da *A. mangium* vão além do incremento de nitrogênio e esta espécie é capaz de proporcionar maior disponibilidade de outros nutrientes, como por exemplo, o fósforo. Segundo PEREIRA et al. (2021) a concentração de fósforo encontrada na fração orgânica da serapilheira foi o dobro nos tratamentos nos quais *A. mangium* estava presente, seja como planta

solteira ou em consórcio, quando comparada com a serapilheira de eucalipto puro, com e sem adubação. Foi observado também que a *A. mangium* proporciona maior diversidade da comunidade microbiana da serapilheira, além de maior abundância do gene *nifH*, mostrando potencial contribuição desta espécie para o ambiente em que está inserida, e assim, promovendo a saúde do sistema (PEREIRA et al., 2019).

2.2. Origem, características, importância econômica e ambiental de *Eucalyptus* sp.

O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália, com ocorrência natural na Nova Guiné e na Indonésia, apresentando mais de 700 espécies reconhecidas botanicamente. No entanto, o número de espécies cultivadas comercialmente é reduzido, não ultrapassando de 20 (JUNIOR; CORCORANE, 2011). No Brasil as espécies mais cultivadas são: *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, sendo estas utilizadas em programas de melhoramento genético para formação de híbridos de alto potencial produtivo como é o caso do *E. urograndis* (*E. grandis* x *E. urophylla*) (CIB, 2008). No caso do *E. urograndis*, o objetivo do cruzamento entre as duas espécies de eucalipto supracitadas foi obter plantas com bom crescimento e maior densidade da madeira, sendo este cruzamento o mais disseminado no Brasil, e isso se deve ao seu ótimo comportamento em viveiro, com taxa de enraizamento maior que 70% e resistência à ferrugem (*Puccinia psiidi*) (EMBRAPA FLORESTAS, 2014).

O Brasil possui aproximadamente 8 milhões de hectares ocupados por florestas plantadas, e sua produção contribui com 6,2% do PIB nacional. O benefício das florestas plantadas vai além do fator financeiro, visto que fatores ecológicos e sociais também são favorecidos, como a diminuição da pressão sobre as florestas nativas e geração de empregos diretos e indiretos (IBÁ, 2017).

As plantações de eucalipto no Brasil se concentram em áreas com baixo potencial agrícola, caracterizadas pela baixa fertilidade do solo e baixa reserva mineral, a exemplo da classe dos Latossolos (GONÇALVES et al., 2013). Mais de 70% da área de florestas plantadas é composta pelo gênero *Eucalyptus*, o qual apresenta produtividade média de $35,7 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, fazendo o Brasil alcançar o topo do ranking global de produtividade florestal no ano de 2016 (IBÁ, 2017). Tal fator é reflexo das condições climáticas favoráveis, melhoramento genético, manejo adequado e aplicação de fertilizantes, bem como alta capacidade e uso de nutrientes deste gênero (LACLAU et al., 2013).

Neste setor florestal, um ponto chave/gargalo é a produção de mudas. O manejo nesta etapa é rigoroso e visa proporcionar melhor desenvolvimento e assim poder garantir que as mudas

sejam mais rústicas e produtivas quando submetidas ao campo (HAASE, 2008; SOUZA et al., 2013). O sistema de produção de mudas mais utilizado comercialmente é o de estaquia, e hoje já há variações deste método, como o de miniestaquia, que proporciona ganho de tempo no processo produtivo. Estas mudas são produzidas a partir de brotações de cepas de árvores adultas, ou a partir de mudas de clones superiores já selecionadas anteriormente, sempre visando qualidades como bom crescimento e/ou resistência a pragas e doenças. Este tipo de propagação tem a característica de maior homogeneidade e as mudas terão as mesmas características da árvore das quais foram retiradas, por isso são chamadas de clones (EMBRAPA FLORESTAS, 2014).

2.3. A importância dos plantios consorciados de *A. mangium* e *Eucalyptus* sp.

A maior parte das espécies de eucalipto cultivadas no Brasil é explorada em monocultivo (ABRAF, 2013), o que tem levado à discussão sobre a sustentabilidade deste cultivo, devido à redução da qualidade do solo, tanto em caráter químico como biológico (RACHID et al., 2013; SANTOS et al., 2016). O balanço negativo de nitrogênio (N) no solo, gerado por este tipo de sistema de plantio está relacionado às baixas reservas deste elemento no solo e à ausência da FBN, sendo ainda intensificado pelas sucessivas rotações com elevadas exportações de N na colheita da madeira (LACLAU et al., 2010; STAPE et al., 2010).

O gênero *Acacia* vem sendo usado como estratégia em sistemas silvipastoris (FOELKEL, 2012) e consórcios com eucalipto (BINI et al., 2013; PEREIRA et al., 2017), como estratégia para recuperação de áreas degradadas, favorecendo a entrada de N nesses sistemas. As espécies mais utilizadas no Brasil são *A. mangium* e *A. mearnsii*, por apresentarem características como baixa incidência de patógenos, habilidade de sombrear competidores rapidamente, capacidade de captar grandes quantidades de água da chuva e alta tolerância à compactação do solo e acidez (pH 4,2 a 6,5) (HEGDE et al., 2013), favorecendo assim seu estabelecimento em campo.

A FBN proporcionada pela simbiose entre *Acacia* sp e bactérias diazotróficas eleva o aporte de nitrogênio no solo, o qual pode ser transferido para as plantas de eucalipto, reduzindo a competição interespecífica pelo nitrogênio mineral (PAULA et al., 2015; SANTOS et al., 2017). Outra forma de disponibilização do nitrogênio para o sistema é através da decomposição da serapilheira, sendo a acácia capaz de depositar cerca de 5 a 12 toneladas de serapilheira ha⁻¹ ano⁻¹, o que resulta em aproximadamente 150 a 300 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N por hectare adicionados ao solo (FOELKEL, 2012). A composição química da serapilheira é uma característica

importante, pois quanto mais rica em N, menor é a relação C/N, o que intensifica a decomposição e a ciclagem de nutrientes no sistema solo-planta (BINI et al., 2013).

Em estudo comparando a qualidade da serapilheira da *Acacia* sp e do eucalipto sob cultivos mistos e solteiros, Koutika et al., (2014) constataram que o conteúdo de nitrogênio da serapilheira do eucalipto foi aproximadamente 3 vezes menor quando comparado à serapilheira da *Acacia* sp. Resultado semelhante foi verificado por Tchichelle et al. (2017), porém, sob cultivo misto, a concentração deste nutriente na serapilheira de ambas as espécies superou aquela encontrada nos tratamentos puros de eucalipto.

2.4. A microbiota do solo como um recurso biotecnológico para a produção sustentável

A microbiota exerce grande influência sobre as plantas que interage com ela, fornecendo proteção contra patógenos e ganhos em crescimento, saúde e produção (BERG et al., 2016). Um dos componentes desta microbiota são as bactérias, que, devido sua capacidade de realizar interações benéficas, têm ganhado destaque em sistemas sustentáveis de cultivos agrícolas (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2018). A agricultura atual, arraigada no contexto da bioeconomia, visa à produção sustentável, buscando novas tecnologias que alie ganhos produtivos com menor impacto ao ambiente inserido. Neste intuito, a utilização de inoculantes tem ganhado destaque por proporcionar redução de insumos artificiais na atividade agrícola (ADESEMOYE; TORBERT; KLOEPPER, 2010; YARTE et al., 2020).

Os inoculantes agrícolas são produtos que contém em sua composição micro-organismos vivos capazes de beneficiar o desenvolvimento vegetal (CARDOSO; ESTRADA-BONILLA, 2019) Podemos citar o “rizóbio” como o exemplo mais antigo da utilização de micro-organismos como inoculantes; estas bactérias diazotróficas colonizam a rizosfera e formam nódulos nas raízes das plantas hospedeiras, plantas da família Fabaceae. Esta simbiose leva ao processo de FBN, que no cultivo de soja, por exemplo, supre praticamente toda necessidade de nitrogênio da planta (HUNGRIA; MENDES, 2015). Além dos rizóbios, outras bactérias diazotróficas, como *Azospirillum*, com relações menos específicas com a planta hospedeira, também é capaz de fornecer N e reduzir as demandas de N de fertilizantes das atividades agrícolas (FUKAMI et al., 2018).

Com isso, a bioprospecção de micro-organismos potencialmente promotores de crescimento de plantas é crescente e almeja encontrar micro-organismos eficientes na promoção de crescimento para cada cultura, os assim chamados biofertilizantes. Para tanto, alguns passos são necessários para atingir tal objetivo, como: isolamento dos micro-organismos, seleção das

características desejáveis, seleção de cepas eficientes na aplicação de campo e produção de inóculos em formulações adequadas. Porém, a eficiência desses biofertilizantes depende, entre outros, da disponibilidade de micro-organismos “ecologicamente competentes” (PANDEY; YARZÁBAL, 2019).

2.5. Produção de Auxinas por bactérias e sua contribuição na promoção de crescimento de plantas.

O ácido indolacético (AIA) é um fitohormônio envolvido na divisão de células vegetais, e estimula sementes e tubérculos a germinar, assim como induz a formação de raízes laterais e adventícias, e é fundamental no desenvolvimento vegetal (KANG et al., 2019). O AIA é considerado um dos fitohormônios vegetais mais estudados que, além da promoção de crescimento de plantas, pode estar associado a algumas patologias, como por exemplo em infecções por *Agrobacterium tumefaciens* (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003). Em outras palavras, o efeito do AIA a nível vegetal é dependente da sua concentração, na qual concentrações baixas poderão estimular o crescimento, enquanto concentrações elevadas podem ser inibitórias (AHMAD; AHMAD; KHAN, 2005).

É sabido que as bactérias podem promover a indução do enraizamento, e o processo de indução radicular ocorre pela síntese de análogos de auxina, o AIA (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). A síntese de AIA pelas bactérias possui duas vias possíveis, uma dependente e outra independente de L-triptofano (aminoácido precursor), sendo a via independente de triptofano exclusiva em bactérias (ZHANG et al., 2019). Este hormônio promove o aumento da área e comprimento da superfície da raiz lateral e resulta em uma melhor arquitetura do sistema radicular, proporcionando à planta maior área de acesso a nutrientes no solo (NWIGWE, 2018). É relatado que 80% das bactérias encontradas no ambiente rizosférico são capazes de produzir AIA como metabólito secundário (NEUBAUER et al., 2000).

Este AIA secretado pelas bactérias interfere nos processos de desenvolvimento da planta, pois o AIA endógeno da planta sofre alteração pela presença do AIA exógeno da bactéria. Esta molécula atua então como sinalizadora recíproca e pode afetar a expressão gênica tanto da planta quanto dos micro-organismos, sendo de fundamental importância no processo de interação planta-micro-organismo (NAZIR; KAMILI; SHAH, 2018).

Sabendo da potencialidade das bactérias em promover enraizamento, pode-se com isso, fazer uso estratégico da inoculação de bactérias. A aplicação de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, por exemplo, o qual teve a introdução da via biossintética de AIA, foi capaz de induzir

ganhos na fixação biológica de nitrogênio, pois com a formação de mais raízes, mais nódulos também foram originados, além disto, foram encontradas concentrações de AIA 60 vezes maior quando comparado com uma estirpe selvagem (ZAIDI et al., 2009). Outro exemplo bem sucedido é a co-inoculação de cepas fixadoras de nitrogênio com cepas produtoras de AIA (*Rhizobium* e *Azospirillum*) na soja, alcançando ganhos em produtividades de 565kg/ha enquanto a inoculação com *Rhizobium* solteiro resultou em ganhos de 212 kg/ha (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015). Estudos também comprovaram a eficiência do *Azospirillum* em estacas de espécie arbórea proporcionando maior porcentagem de enraizamento (ROSA et al., 2018).

2.6. Utilização de bactérias promotoras de crescimento na produção de mudas silvícolas.

Uma variável importante para analisar o bom desenvolvimento de mudas é o sistema radicular, já que este é responsável pelo transporte de seiva bruta e assim, garantir a nutrição da muda (ALMEIDA et al., 2017). Sistema radicular com raiz principal não enovelada e raízes secundárias bem distribuídas e agregadas ao substrato são características almejadas em mudas (MAFIA et al. 2005). O desenvolvimento de um sistema radicular vigoroso é função tanto do potencial genético e nutricional da planta quanto do microbioma associado a esta. Neste sentido, bactérias que compõe a microbiota do solo são peças-chaves.

Dentro do grupo de bactérias, denomina-se como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), do inglês *plant growth-promoting bacteria* (PGPB), aquelas capazes de beneficiar as plantas por múltiplos mecanismos benéficos (diretos e indiretos). Dentre os mecanismos diretos de promoção de crescimento de plantas citam-se a produção de fitohormônios (auxinas, giberelinas e citocininas, ácido abscísico e ácido jasmônico) (LUCY; REED; GLICK, 2004; SHARON et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017), solubilização de fosfatos (OTEÍNO et al., 2015), solubilização de potássio (MEENA; MAURYA; VERMA, 2014) e a fixação biológica de nitrogênio (ZULUAGA et al., 2020).

Dentre os mecanismos indiretos citam-se a supressão de patógenos (BERG et al., 2016), seja pela produção de antibióticos (BASHAN; DE-BASHAN, 2005) ou produção de enzimas líticas (GLICK, 2012), produção de sideróforos (BASHAN; de-BASHAN, 2005) ou a indução de resistência sistêmica (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Ainda dentro dos mecanismos indiretos, pode-se destacar a indução da tolerância ao estresse hídrico pela formação de biofilme e produção de exopolissacarídeos (BEAUREGARD, 2015).

Filogeneticamente, os principais grupos de BPCP estão associados a Proteobacteria e Firmicutes. Em níveis mais específicos do filo Proteobacteria destacam-se a classe Alphaproteobacteria com o gênero *Rhizobium*, a classe Betaproteobacteria, com os gêneros *Burkholderia* e *Achromobacter* e a classe Gammaproteobacteria com os gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea* e *Enterobacter*. Além disso, em níveis mais específicos do filo Firmicutes, se destaca o bem conhecido gênero *Bacillus* na composição de inoculantes microbianos com atividade promotora de crescimento plantas (CHEN et al., 2006, 2010; DONG et al., 2008; ROJAS-TAPIAS et al., 2012; BATISTA et al., 2018).

A utilização de BPCP vem se consolidando na agricultura, sendo o uso em espécies florestais um campo promissor tanto economicamente quanto ambientalmente e que vem se expandindo. Alguns trabalhos já elucidaram o uso de BPCP como biofertilizante em espécies arbóreas como carvalho, eucalipto e pinheiro, nos quais o uso de BPCP proporcionou a obtenção de mudas mais vigorosas com maior desempenho e sobrevivência em plantios de reflorestamento (BASHAN et al., 2012; LUCY; REED; GLICK, 2004; RAHMAN et al., 2018; RIBEIRO; CARDOSO, 2012).

No entanto, é válido pontuar que na maioria das vezes algumas cepas bacterianas específicas podem promover o crescimento apenas em certas espécies de árvores, sendo moduladas por fatores ambientais (LUCY; REED; GLICK, 2004). Desta forma, um ponto importante no isolamento é buscar cepas de BPCP nativas para desenvolvimento de biofertilizantes eficientes para uso na silvicultura.

A utilização de BPCP em sistemas de produção de mudas de eucalipto ainda apresenta poucos estudos. Desta forma, pesquisas voltadas a aplicação desses micro-organismos em produção de mudas são fundamentais para obtenção de respostas de interações a fim de encontrar micro-organismos com maior eficiência nos processos citados anteriormente, podendo proporcionar resultados positivos à atividade de produção de mudas, produzindo mudas mais robustas e resistentes quando levadas a campo (SILVA, 2018).

Foi evidenciado que a *A. mangium* possui potencial para a seleção de comunidades bacterianas sob manejo consorciado com eucalipto. Evidenciou-se que a estrutura do microbioma bacteriano associado a eucalipto e *A. mangium*, em cultivo misto, foi mais similar à estrutura da comunidade bacteriana da *A. mangium* do que do eucalipto, quando cultivados solteiros (PEREIRA et al., 2017). Além disso, a *A. mangium* mostrou potencial de promover aumento da diversidade da comunidade bacteriana e abundância de genes funcionais

relacionados ao ciclo do C e N, propiciando melhor ciclagem e disponibilização dos nutrientes (PEREIRA et al., 2019).

Diante do exposto e visando aprimorar a etapa de produção de mudas, é válida a busca por novas biotecnologias que tragam ganhos qualitativos e quantitativos na produção de mudas, como o uso de BPCP. Assim, a *A. mangium* mostra-se promissora como fonte de micro-organismos com potencial de promoção de crescimento de mudas de eucalipto.

3. HIPÓTESES

A *A. mangium* abriga bactérias promotoras de crescimento de plantas com potencial de promover crescimento em mudas de *E. urograndis*.

O consórcio bacteriano dos isolados obtidos de solo não rizosférico, rizosférico e endofítico de raiz associado a *A. mangium*, apresenta maior potencial de crescimento de mudas de *E. urograndis* quando comparado ao efeito isolado.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Realizar isolamento, seleção e caracterização fisiológica de bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas ao solo rizosférico, não-rizosférico e endofíticas de raiz de *A. mangium* e avaliar o potencial biotecnológico dos isolados obtidos em promover o crescimento em mudas de *E. urograndis*, isoladamente ou em consórcio.

4.2. Objetivos específicos

- Isolar bactérias do solo não rizosférico, do solo rizosférico e endofíticas de raiz das plantas de *A. mangium* e caracterizar fisiologicamente, *in vitro*, quanto às diferentes características de promoção do crescimento vegetal;
- Avaliar o potencial dos isolados e consórcio bacteriano no enraizamento e promoção de crescimento de mudas de *E. urograndis*;
- Caracterizar, através de técnicas moleculares, os isolados bacterianos que foram utilizados no teste de enraizamento de mudas de *E. urograndis*;

5. MATERIAL e MÉTODOS

5.1. Descrição da área de coleta

O estudo foi conduzido na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga (EECFI), localizada no município de Itatinga-SP (23°03'10"S - 48°37'50"W), pertencente à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger, o clima da região é o Cfa (clima subtropical húmido com verão quente) (LACLAU et al., 2010), com temperatura média anual de 19,4°C, sendo a média do mês mais frio (julho) 15,6°C e a média do mês mais quente (janeiro) 22,3°C. A precipitação pluvial média anual é de 1.319 mm, com 75% concentrada nos meses de outubro a março (ALVARES et al., 2013).

Os solos predominantes na área são classificados como Latossolo Amarelo distrófico, de textura médio-arenosa (EMBRAPA, 2013). A vegetação natural da região é o Cerrado *stricto sensu* e o histórico de uso nos últimos 30 anos restringe-se a rotação da monocultura de *E. grandis* (SANTANA, 2017; PEREIRA, 2018).

A área de estudo utilizada integra o projeto de pesquisa intitulado “Intensificação ecológica de plantações de eucaliptos pela associação com espécies leguminosas arbóreas fixadoras de nitrogênio”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos nº: 10/16623-9 e 13/23925-0), e coordenado pelos pesquisadores Dr. José Leonardo de Moraes Gonçalves e Dr^a. Carolina Braga Brandani.

5.2. Delineamento experimental da área de coleta

O delineamento experimental foi instalado em dezembro de 2013 utilizando o delineamento experimental em blocos casualizados (DBC) composto por quatro blocos (B) e dez tratamentos (T). Os tratamentos foram instalados em parcelas de 36 m² contendo 144 árvores dispostas em 12 linhas. Porém, para desenvolvimento da presente pesquisa foram selecionados três blocos do tratamento T6, no qual as árvores foram arranjadas na parcela experimental em duas linhas de *A. mangium* seguidas de duas linhas de *E. grandis* na proporção 1:1 em espaçamento 3x3 m (Figura 1). Este tratamento foi selecionado devido à influência de ambas as espécies, *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*, possibilitando a obtenção de isolados previamente adaptados e recrutados por ambas as espécies.

Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental selecionado para amostragem de solo não rizosférico e rizosférico e raízes. No lado esquerdo, mostra-se em cor preta o tratamento utilizado para coleta (T6), distribuído em três diferentes blocos utilizados para coleta, enquanto na parte sem inscrições estão os demais tratamentos que compõe o experimento. No lado direito, em cores, observa-se a composição detalhada do tratamento utilizado para coleta.

5.3. Estratégia de amostragem

A coleta das amostras ocorreu em fevereiro de 2019, quando as árvores estavam com cinco anos de implantação. Foram selecionadas duas árvores de *A. mangium* de cada parcela experimental para a coleta de solo não rizosférico, solo rizosférico e raízes.

Figura 2: Representação de coleta dos pontos amostrais ao redor das plantas de *A. mangium*.

As árvores selecionadas situavam-se na região central das parcelas para evitar o efeito de borda (Figura 2). Em cada árvore foram delimitados cinco pontos amostrais aleatórios, na projeção das copas, medindo 30 x 30 cm, com profundidade de 10 cm, nos quais foram coletadas amostras simples, que posteriormente foram homogeneizadas em uma amostra composta. Ao final, foram obtidas 18 amostras compostas, sendo seis de solo não rizosférico, seis de rizosfera e seis de raízes.

As amostras de solo foram coletadas distantes das raízes para eliminar ao máximo o efeito da zona radicular. Considerou-se rizosfera o solo aderido às raízes (JOERGENSEN, 2000; REID et al., 1984; WOLLUM II, 1994). E, para a coleta de raiz, raízes finas ($\varnothing \leq 2$ mm) foram cuidadosamente removidas do solo, e o solo frouxamente aderido às raízes foi removido por agitação manual (TURNBULL; LIU; LAZAROVITS, 2012). Para garantir que as raízes amostradas eram de *A. mangium*, foram coletadas apenas raízes com formação de nódulos. Por fim, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas, mantidas refrigeradas, e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do solo, da ESALQ-USP, onde foram mantidas refrigeradas (4°C).

5.4. Processamento das amostras, isolamento e contagem das unidades formadoras de colônia

O processamento das amostras foi realizado no laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ-USP. Exatos 10g de solo não rizosférico e de solo rizosférico foram adicionados, separadamente, de forma asséptica, a Erlenmeyers contendo 90 mL de solução tampão Phosphate Buffered Saline (PBS) estéril e submetido à agitação orbital (150 rpm) por 40 min em temperatura ambiente. Posteriormente, diluições decimais em série foram realizadas em solução salina estéril (até 1×10^{-6}) e 100 μ L das diluições 1×10^{-4} , 1×10^{-5} e 1×10^{-6} foram transferidos, por espalhamento, em duplicata, em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA 10%), as quais foram incubadas a 30 °C por 72 h (SILA, 2014).

Para o isolamento das bactérias endofíticas das raízes de *A. mangium*, foi realizada a desinfestação superficial das amostras, através de lavagem por 1 min em etanol 70%; 3 min em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% de cloro ativo (v/v) e 30 s em etanol 70%, seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada (LIMA, 2012). Posteriormente, as raízes foram cortadas em pequenos fragmentos e trituradas em 10 mL de solução tampão (PBS). Logo após, todo o material foi transferido para tubos falcon de plástico de 50 mL e mantido sob agitação constante a 150 rpm por 40 min em temperatura ambiente. Em seguida, diluições decimais em série foram

realizadas em tampão PBS estéril (até 1×10^{-4}) e 100 μL das diluições 1×10^{-3} , 1×10^{-4} foram transferidos, por espalhamento, em duplicata, em placas de Petri contendo TSA (10%), as quais foram incubadas a 30 °C por 72 h (LIMA, 2012).

Após a incubação, placas contendo 20-200 colônias foram utilizadas para contagem de bactérias cultiváveis nas condições empregadas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de solo seco (UFC g^{-1} solo seco) (SANTOS, 2010). Todas as placas com diferentes diluições foram avaliadas quanto à morfologia das colônias bacterianas. Colônias com aspectos morfológicos distintos, foram selecionadas para isolamento em culturas puras por meio da técnica de esgotamento em placas de TSA. Os isolados foram mantidos a 4°C em TSA (10%) e a -20°C em meio de cultivo em TSA a 50%, com 10% do líquido proveniente da diluição, acrescida de 50% de crioprotetor (glicerol 50%, resultando em concentração final de 25%). As bactérias mantidas em placas foram transferidas para novas placas a cada 60 dias (SILA, 2014). As bactérias isoladas foram nomeadas quanto ao ambiente de coleta, solo não rizosférico (S), solo rizosférico (R) e endofíticas de raiz (E), empregando-se também um número sequencial de 1 a 40 (S), de 41 a 80 (R) e de 81 a 104 (E).

5.5. Caracterização *in vitro* dos isolados quanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas e processo de preparação dos isolados para inoculação

Os isolados selecionados, 40 isolados do solo não rizosférico, 40 isolados do solo rizosférico e 24 isolados endofíticos de raiz, totalizando 104 isolados, foram submetidos ao teste de caracterização quanto à capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, produzir exopolissacarídeos e sintetizar ácido indolacético como descrito nas seções 5.5.1 a 5.5.4. Tais mecanismos de promoção de crescimento foram utilizados por serem os mais utilizados em programas de caracterização de isolados e por estarem estritamente relacionados à ciclagem de nutrientes (fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos), à tolerância a estresses abióticos (produção de exopolissacarídeos) e indução de crescimento radicular (síntese de AIA) (GLICK, 2012).

Para inoculação, os isolados mantidos em placas de Petri contendo meio TSA (10%), foram cultivados em meio líquido (TSA 10%) por 48h sob agitação constante de 150 rpm e, posteriormente, 5 μL do inóculo assim preparado foi transferido para os respectivos meios de caracterização de promoção de crescimento vegetal (SILA, 2014).

5.5.1. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

Para a detecção da fixação biológica de nitrogênio, 5 μ L do inóculo obtido conforme descrito no item 5.5. (em meio líquido TSA (10%)) foram transferidos para tubos de penicilina previamente esterilizado e contendo o meio NFb (Nitrogen fixation broth) (Anexo 2) (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999), em triplicata. As amostras foram incubadas a 28 °C durante 5 dias. O resultado positivo para FBN foi caracterizado pela mudança de coloração do meio de cultura e formação de halo horizontal dentro do meio de cultura (Figura 3) (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999).

Figura 3: Meio semissólido NFb, para caracterização de fixadores biológicos de nitrogênio. A) ausência de fixação de nitrogênio, B) presença de fixação de nitrogênio.

5.5.2. Solubilização de Fosfato inorgânico de Cálcio bibásico (SFi)

Na análise de SFi, 5 μ L do inóculo obtido conforme descrito no item 5.5. foram transferidos para discos de papel de filtro comum, de 5 mm $\varnothing$, colocados sobre meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel, o fosfato de cálcio bibásico (Anexo 3) (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), em triplicata. As amostras foram incubadas a 28°C durante 6 dias e posteriormente avaliados. Os diâmetros ($\varnothing$) dos halos de solubilização (área translúcida ao redor da colônia) e da colônia foram medidos utilizando paquímetro digital (Figura 4). Com posse dessas medidas, o índice de solubilização foi calculado por meio da razão entre diâmetro do halo e diâmetro da colônia (HARA; OLIVEIRA, 2004).

Figura 4: Meio para caracterização de solubilizadores de fosfato inorgânico. A) Isolados solubilizadores, B) Isolados não solubilizadores.

5.5.3. Produção de Exopolissacarídeos (EPS)

A avaliação da produção de EPS foi realizada a partir da transferência de 5 μ L do inóculo produzido em meio líquido TSA (10%) conforme descrito no item 5.5., para discos de papel de filtro comum, de 5 mm $\varnothing$, colocados sobre meio de cultura sólido modificado (Anexo 4) (SILVA, 2014), em triplicata. As amostras foram incubadas a 28°C durante 3 dias e posteriormente avaliados. A produção de EPS foi caracterizada visualmente mediante aferição do diâmetro da colônia ($\varnothing$) com auxílio de paquímetro digital (Figura 5) (KAVAMURA et al. 2013).

A confirmação da produção de EPS foi realizada coletando-se materiais celulares das colônias bacterianas com alça de platina e colocando-se em tubos com 2 mL de álcool etílico. Quando ocorria a precipitação do EPS, considerou-se como produção positiva, enquanto a produção negativa foi considerada quando o meio permaneceu turvo (KAVAMURA et al., 2013).

Figura 5: Meio para caracterização de produtores de EPS. A) Isolados não produtores de EPS, B) Isolados produtores de EPS.

5.5.4. Produção de ácido indolacético (AIA)

Para a quantificação de AIA, 5 μL do inóculo obtido conforme descrito no item 5.5. foram transferidos para o meio TSA contendo 0,2 % de L-triptofano e incubados a 28 °C por um período de 16h, na ausência de luz e sob agitação de 150 rpm (SILVA, 2014). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2100 g por 12 min, para obtenção do sobrenadante; 1 mL do sobrenadante obtido foi transferido para um tubo com 2 mL de reagente de Salkowski (GLICKMANN; DESSAUX., 1995). Posteriormente, a mistura foi incubada no escuro durante 30 min. O desenvolvimento da cor rósea foi tomado como uma indicação da produção de AIA (Figura 6). Em seguida, foi realizada a leitura da Densidade Ótica (DO) a 530 nm usando espectrofotômetro (SILVA, 2014). A concentração de AIA no meio de cultura foi determinada pela comparação com uma curva padrão, utilizando-se AIA comercial, por meio da equação $y = 0,0074x - 0,0026$, onde x equivale aos valores de absorbância obtidos e y equivale a concentração de AIA produzido. A curva foi obtida a partir de padrões nas concentrações de 0; 5; 10; 20; 50; 80; 100 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 6) (RAHMAN et al., 2018).

Figura 6: Meio acrescido de L-triptofano após reação com reagente de Salkowski. A) Curva para calibração a partir de AIA sintético. B) AIA produzidos pelos isolados.

5.6. Seleção dos isolados com base na produção de AIA para o teste de promoção de crescimento em mudas de *E. urograndis*

Após a obtenção e caracterização dos isolados dos diferentes locais (solo não rizosférico, solo rizosférico e endofítico de raiz), elegeu-se a produção de AIA como o mecanismo chave para a seleção dos isolados para o teste de promoção de crescimento. Selecionaram-se os 10 isolados que mais produziram AIA dentro de cada ambiente estudado. O AIA pertence ao grupo das auxinas e foi escolhido por se tratar de um hormônio vegetal indutor do crescimento da planta que facilita o início do desenvolvimento das raízes, divisão celular e alongamento (PATTEN; GLICK, 2002).

5.7. Teste de promoção de crescimento em mudas de *E. urograndis* para selecionar os isolados para compor o consórcio bacteriano

Miniestacas de *E. urograndis* foram preparadas com tamanho de 10 cm contendo de 2 a 3 pares de folha (OLIVEIRA et al., 2012). Para inoculação, o pré-inóculo foi obtido a partir do cultivo em meio líquido TSA 10% por 48h, à temperatura de 28°C, sob agitação constante de 150 rpm para cada isolado previamente selecionado. Posteriormente, o meio de cultura

contendo o inóculo foi centrifugado a 6.000 rpm por 6 min. Em seguida, o meio de cultura foi descartado e o inóculo ressuspensionado em tampão PBS, sendo posteriormente realizada leitura da Densidade Óptica (DO) em espectrofotômetro. A suspensão do inóculo foi ajustada para 0,1 (DO_{550nm}) (BARBOSA, 2017). As miniestacas foram imersas no inóculo por 30 min e plantadas em seguida em tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade contendo substrato comercial Plantmax®.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em triplicata, com 32 tratamentos (30 isolados, sendo 10 de cada ambiente (S, R e E) e dois controles, sendo um sem bactéria e o outro sem bactéria com aplicação de AIA sintético (6,05 µg ml⁻¹), como controle positivo para avaliação do efeito do AIA (BARBOSA, 2017), totalizando 96 unidades experimentais. As miniestacas foram levadas para casa de vegetação, onde permaneceram 30 dias entre 30-35°C, com nebulização intermitente para garantir elevada umidade relativa (acima de 80%) (Figura 7) (FILHO; MATHIAS; NETO, 2018). Ao final do teste de promoção de crescimento, as mudas foram submetidas à avaliação do comprimento da parte aérea, diâmetro do coleto, diâmetro médio da raiz, massa da matéria seca da parte aérea e raiz e área superficial da raiz.

A massa da matéria seca da parte aérea e raiz foram aferidas em balança analítica após secagem em estufa com ventilação forçada (temperatura = 65°C) por 3 dias. O comprimento da parte aérea foi aferido com auxílio de régua graduada de 30 cm, e o diâmetro do coleto com auxílio de paquímetro, considerando o coleto a zona de interseção de raiz e caule (SILVA et al., 2015).

Para análise do diâmetro médio da raiz e área superficial da raiz, as plantas tiveram suas raízes separadas da parte aérea e lavadas para análise seguindo o método do Scanner (software WinRHIZO®). Para isso, as raízes foram espalhadas em camada de água em bandeja (30 cm x 20 cm), e sua imagem foi capturada em resolução de 400 dpi (pontos por polegada) com um sistema de scanner profissional Epson® Expression 11000XL. As imagens foram analisadas para diâmetro médio e área superficial da raiz, utilizando o software WinRHIZO Arabidopsis (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada), conforme metodologia proposta por RACHSEL et al, 2009.

O objetivo desta etapa experimental foi selecionar o melhor isolado dentro de cada ambiente para compor o consórcio bacteriano a ser utilizado na próxima etapa experimental. Concomitantemente, os 30 isolados (10 de cada ambiente) foram caracterizados genotipicamente como descritos na seção 5.7.

Figura 7: Instalação e manutenção do teste de promoção de crescimento em miniestacas de *E. urograndis* com a inoculação dos isolados selecionados pela capacidade de sintetizar AIA.

5.8. Identificação molecular das bactérias isoladas do solo, da rizosfera e das raízes de *A. mangium*.

5.8.1. Extração de DNA

O DNA dos isolados selecionados foi extraído utilizando protocolo de bancada. Utilizaram-se 2 mL da cultura bacteriana desenvolvida em 24h, centrifugou-se à 14 000g por 5 min, após este passo foi descartado o sobrenadante e ressuspendido o precipitado em 500 μ L de TE (TRIS HCL 1 M+ EDTA 0,5 M), adicionaram-se 10 μ L de NaSO_4 10% e uma colher de beads autoclavadas (Glass beads, acid-whased), os frascos Eppendorf foram agitados levemente 5 vezes em seguida e foi centrifugado à 14000g por 1 min. Após este passo, foram adicionados 500 μ L de solução contendo fenol, clorofórmio e álcool isopropílico (25:24:1) e agitou-se no vórtex. Logo após foi centrifugado à 14000g por 10min e em seguida coletaram-se 450 μ L e transferidos para um novo tubo. Foram adicionados 50 μ L de acetato de sódio 3M e 600 μ L de álcool isopropílico, agitando no vórtex e, em seguida, as amostras foram incubadas por 5 min em freezer (-20°C). Em seguida as amostras foram centrifugadas à 14000g por 10 min, descartando o sobrenadante e colocando os tubos invertidos por 30 min para secar. Ao fim, o

DNA foi ressuspenso em 30 μ L de água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C (JIMÉNEZ; MCCOY; ACHÍ, 2010).

5.8.2. Amplificação do rRNA ribossomal

O DNA genômico de cada isolado bacteriano foi utilizado como molde para amplificação da região do gene 16S através de PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT), para a amplificação no sentido *forward* e *reverse*, respectivamente (LANE, 1991).

As reações foram realizadas em volume final de 50 μ L contendo 5 μ L de PCR buffer, 3,75 μ L de MgCl_2 (3,75 mM), 4 μ L de dNTP's (0,20 mM), 0,1 μ L de cada primer (pmol/ μ L), 0,05 U/ μ L da enzima Taq DNA polimerase (Taq Platinum) e 1 μ L do DNA genômico. As condições de termociclagem foram: $94^{\circ}\text{C}/4$ minutos, 35 ciclos de amplificação ($94^{\circ}\text{C}/30$ segundos, $63^{\circ}\text{C}/1$ minuto, $72^{\circ}\text{C}/1$ minuto), $72^{\circ}\text{C}/10$ minutos. Após a amplificação, foram retirados 5 μ L do produto de reação de PCR, para avaliação por eletroforese em gel de agarose 1,5% para visualizar a integridade das amostras. Por fim, o gel foi visualizado e foto-documentado em um transiluminador sob luz ultravioleta (DNR – Bio Imaging Systems/MiniBis Pro). O tamanho do fragmento esperado era de aproximadamente 1500 pares de base.

5.8.3. Sequenciamento, classificação e construção do dendrograma

A reação de sequenciamento foi realizada com o sequenciador automático de primeira geração (Método de Sanger ou terminação da cadeia) (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1997), no Laboratório de Biotecnologia Animal/ Departamento Zootecnia, ESALQ/USP. Nesse método as sequências de DNA foram analisadas com o auxílio do *software* BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL, 1990), no qual foram alinhadas contra o banco de dados no site do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI)(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências foram classificadas a nível de gênero de acordo com a entrada da base de dados que obteve o menor *e-value* e maior identidade para cada alinhamento (melhores *hits*).

Todas as sequências de 16 RNAr obtidas nesse trabalho, em conjunto com os 3 melhores hits de cada alinhamento foram alinhadas usando MEGA X. A matriz de distância calculada a partir desse alinhamento múltiplo foi utilizada para a obtenção do dendrograma através do método e com base em UPGMA e no algoritmo neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987).

5.9. Avaliação da eficiência do consórcio bacteriano na promoção de crescimento de mudas de *E. urograndis*.

Um isolado de cada ambiente (solo não rizosférico, rizosfera e endofíticos de raiz) foi selecionado, considerando o melhor resultado no teste de promoção de crescimento, conforme descrito na seção 5.6.1 e baseado no coeficiente de correlação obtido da análise de componentes principais usado devido à ausência de diferenças estatísticas entre os isolados dentro de cada ambiente. Também foi realizado teste de antagonismo entre as bactérias selecionadas, para confirmar que há compatibilidade. Nesta etapa experimental, preparou-se o consórcio bacteriano usando as bactérias *Dyella* sp. (S), *Burkholderia* sp. (R), *Pseudomonas* sp. (E), as quais foram usadas para inocular as miniestacas de *E. urograndis* com o objetivo de se avaliar a promoção de crescimento. As diferentes composições dos consórcios bacterianos usados são encontradas na Tabela 1.

O delineamento adotado neste experimento foi o inteiramente casualizado (DIC), com 8 repetições para cada tratamento, totalizando 96 unidades experimentais. A produção de inóculo seguiu o mesmo método descrito no item 5.2.1. Após preparação do inóculo, as miniestacas foram imersas no inóculo por 30 min e plantadas em bandejas contendo substrato comercial Plantmax®. Em seguida, foram levadas para casa de vegetação, onde permaneceram 30 dias entre 30-35°C, com nebulização intermitente para garantir elevada umidade (acima de 80%) (FILHO; MATHIAS; NETO, 2018) e, então, foram transferidas para casa de sombra (aproximadamente 50 % de pleno sol) por mais 20 dias. Após este período as mudas foram reinoculadas, com aplicação de 2 mL do inóculo com concentração de 0,1 (DO₅₃₀) e levadas para pleno sol onde permaneceram por 30 dias nesse ambiente, totalizando 80 dias (PAULA; VALERI; MEDEIROS, 2016). Nas condições de crescimento a pleno sol, as mudas receberam manejo da irrigação por sistema automático de irrigação, com 4 irrigações diárias com duração de 10 min por rega (PAULA; VALERI; MEDEIROS, 2016). Neste período as mudas também passaram a receber adubação de cobertura, com 4 mL da solução de Hoagland em dias alternados. Nos tratamentos com 50% da adubação, a solução de Hoagland foi diluída na proporção 1:1 com água destilada (HOAGLAND; ARNON, 1950).

Ao fim, as mudas de *E. urograndis* foram submetidas à avaliação biométrica, onde foram determinados o comprimento da parte aérea (CPA), o diâmetro do coleto (DC), diâmetro médio da raiz (DMR), massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e a massa da matéria seca da raiz (MSR), área superficial da raiz (ASR) e área superficial foliar (ASF), para avaliar a eficiência do consórcio bacteriano inoculado.

Para as análises de DCMR, ASR, MSPA e MSR seguiu-se o mesmo procedimento descrito no tópico 5.5.1. Para análise de ASF, as plantas tiveram suas folhas separadas do pecíolo e as folhas foram escaneadas em impressora WorkCentre™ 3119. As imagens foram submetidas a estimativas de área foliar pelo software ImageJ, disponível gratuitamente via internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (PÉREZ-HARGUINDEGUY et al., 2016).

Tabela 1: Composição dos tratamentos para avaliação do desempenho do isolados utilizado em consórcio ou não, considerando a adubação completa (100%) ou reduzida (50%) e na presença ou ausência de autoclavagem do substrato.

Tratamentos	Bactéria do ambiente solo (S 33)	Bactéria do ambiente rizosfera (R 55)	Bactéria do ambiente endofítico da raiz (E 081)	Adubação (%)	Substrato autoclavado
DCP	X	X	X	100	–
DC	X	X	–	100	–
DP	X	–	X	100	–
CP	–	X	X	100	–
D	X	–	–	100	–
C	–	X	–	100	–
P	–	–	X	100	–
T	–	–	–	100	–
DCP 50%	X	X	X	50	–
T 50%	–	–	–	50	–
DCP A	X	X	X	100	X
T A	–	–	–	100	X

Legenda: D = presença da bactéria do ambiente solo (*Dyella*), C = presença da bactéria do ambiente rizosfera (*Chryseobacterium*), P = presença da bactéria do ambiente endofítico (*Pseudomonas*), T = testemunha (sem inoculante), 50% = condição de 50% da adubação, A = condição de substrato autoclavado, X indica presença, enquanto – indica ausência.

5.10. Análise estatística dos dados

Para análise dos resultados do teste de promoção de crescimento vegetal e avaliação da eficiência da inoculação de consórcios bacterianos nas mudas de *E. urograndis* inoculadas, os dados foram submetidos ao teste de normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk) e homogeneidade

da variância (Bartlett). Quando as premissas (normalidade e homogeneidade) foram atendidas, realizou-se a ANOVA (análise de variância). Obtendo o F significativo ($p < 0,05$), o teste de comparações múltiplas de médias (HSD Tukey) foi realizado a 5% de significância. Quando não atendidas as premissas da ANOVA, foi realizado o teste não paramétrico (Kruskal-Wallis).

Para a análise estatística dos dados de UFC objetivando a comparação dos três ambientes, transformou-se inicialmente o UFC g^{-1} solo seco em $\log (C+1)$, no qual C corresponde ao número de UFC. De acordo com Vieira e Nahas (2000) essa conversão é necessária quando se pretende verificar a proporcionalidade entre as médias e desvios padrões entre os tratamentos avaliados.

O objetivo da análise univariada no teste de promoção de crescimento vegetal foi encontrar o potencial isolado de cada local de proveniência para compor o consórcio bacteriano. Na ausência de diferenças significativas entre os isolados, dentro de cada ambiente, adotou-se uma análise baseada na observação dos autovalores e autovetores obtido a partir da análise de componentes principais (ACP). Para tanto, a análise multivariada ACP foi realizada, considerando as variáveis com resultados mais expressivos (diâmetro médio da raiz, matéria seca da raiz e área superficial da raiz). Inicialmente foi selecionada a variável com maior contribuição considerando o somatório das duas primeiras componentes (ACP1 + ACP2). Em seguida foram selecionadas as bactérias que mais se correlacionaram com a variável de maior contribuição. Dentre as bactérias que mais se correlacionaram, elegeu-se as de maior contribuição nas duas primeiras componentes. Desse modo, obteve-se, de cada local, uma única bactéria para compor o consórcio.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R (TEAM, R. Core et al 2013) com o pacote estatístico agricolae (MENDIVURU., 2020) e factominer (LÊ et al., 2008) e factoextra (KASSAMBARA et al., 2017).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)

A partir da contagem em placas do isolamento bacteriano dos diferentes ambientes (solo não rizosférico, solo rizosférico e endofíticos de raiz) da *A. mangium*, observou-se que o número de unidades formadoras de colônias foi menor para os endofíticos de raiz ($1,87 \times 10^4$ UFC g⁻¹ raiz) e maior para o solo rizosférico ($9,03 \times 10^5$ UFC g⁻¹ solo seco) e para o solo não rizosférico ($1,62 \times 10^6$ UFC g⁻¹ solo seco) (Figura 8).

Figura 8: Número de unidades formadoras de colônias obtidas a partir do isolamento de bactérias do solo não rizosférico (S), do solo rizosférico (R) e endofíticas de raiz (E), das plantas de *Acacia mangium*. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O sabido gradiente de diversidade microbiana e nutricional que existe nos compartimentos do solo, associado com as características inerentes às plantas, como a idade, o tipo de metabolismo e o requerimento nutricional, são essenciais e conduzem para um claro entendimento do resultado obtido no número de unidades formadoras de colônias. Em outras palavras, percebeu-se o gradiente bacteriano, o qual diminui do solo para o ambiente endofítico, mesmo que não tenha havido diferenças estatísticas entre o solo e rizosfera, foi nítida a redução mediana das UFC. O menor número de UFC encontrado para os endofíticos de raiz reforça a especificidade de colonização microbiana neste ambiente, o qual é resultado de um recrutamento, geralmente da rizosfera, por parte da planta, o qual proporciona uma interação

positiva entre plantas e bactérias. De acordo com Liu et al. (2017) o microbioma no ambiente endofítico da raiz é significativamente menos diverso do que o microbioma da rizosfera e do solo não rizosférico. Portanto, os resultados aqui obtidos estão em consonância com os relatados na literatura. Para Bulgarelli et al. (2013), o número estimado de bactérias endofíticas de raiz varia entre 10^4 - 10^8 g⁻¹ raiz, enquanto para a rizosfera e o solo não rizosférico o número oscila entre 10^6 - 10^9 g⁻¹ solo. Portanto, percebe-se a existência de um filtro de seleção microbiana em direção ao interior da planta, o qual carece sempre de aprimoramento do entendimento, sendo a chave para a adoção de práticas que permitam uma exploração mais sustentável dos recursos biológicos como o solo e os micro-organismos (RYAN et al., 2007; ANDREOTE; SILVA, 2017).

6.2. Caracterização *in vitro* dos isolados quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

Dos 40 isolados selecionados do solo não rizosférico para avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento em plantas *in vitro*, 26 (65%) isolados foram capazes de fixar nitrogênio, apenas 4 (10%) dos isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio bibásico e 21 (52,5%) foram capazes de produzir EPS. Todos os isolados foram capazes de sintetizar AIA utilizando o triptofano como precursor, variando entre 3,33 à 307,85 µg/mL para os isolados S 36 e S 16, respectivamente. 26 isolados (65%) obtiveram uma produção de AIA entre 1 – 11 µg.mL⁻¹, enquanto 2 (5%) dos isolados produziram AIA > 50 µg.mL⁻¹ (Tabela 2, Figura 9), seguindo classificação de Kavamura, (2012).

Tabela 2: Característica de promoção de crescimento de plantas *in vitro* dos isolados do solo não rizosférico (S) cultivado com *A. mangium*.

Isolado	FBN	SFI	EPS	AIA
S 01	-	- -	- -	7,74 ± 1,94
S 02	-	- -	14,01 ± 0,52	7,24 ± 0,70
S 03*	-	- -	7,26 ± 0,11	13,41 ± 4,34
S 04	+	- -	- -	6,75 ± 0,77
S 05	+	- -	9,86 ± 0,88	6,75 ± 1,10
S 06	-	- -	11,36 ± 0,46	4,81 ± 0,27

Continua...

S 07	+	1,11 ± 0,03	11,15 ± 0,13	9,00 ± 1,11
S 08*	-	- -	5,93 ± 0,16	14,77 ± 0,67
S 09	+	- -	8,45 ± 0,46	5,12 ± 1,36
S 10*	-	- -	- -	21,79 ± 10,60
S 11	-	- -	7,46 ± 0,00	5,71 ± 0,20
S 12	-	- -	- -	5,89 ± 1,40
S 13	+	- -	- -	3,59 ± 0,36
S 14	+	- -	- -	11,66 ± 1,08
S 15	-	- -	- -	10,55 ± 0,88
S 16*	-	- -	10,32 ± 0,62	307,85 ± 14,80
S 17*	+	- -	8,34 ± 0,56	299,74 ± 3,85
S 18	-	- -	- -	5,35 ± 2,45
S 19	-	- -	8,96 ± 1,09	6,70 ± 0,14
S 20	+	- -	8,45 ± 0,50	7,24 ± 2,04
S 21	+	- -	12,05 ± 0,93	3,37 ± 0,92
S 22	+	- -	- -	7,29 ± 0,41
S 23	-	- -	8,10 ± 0,64	9,99 ± 0,34
S 24	+	- -	- -	3,37 ± 0,92
S 25*	-	- -	8,40 ± 0,05	15,58 ± 4,04
S 26	+	1,68 ± 0,11	- -	10,62 ± 3,04
S 27	+	- -	- -	6,70 ± 1,29
S 28*	+	- -	28,53 ± 6,09	15,53 ± 2,45
S 29	+	- -	8,17 ± 0,08	4,99 ± 0,79
S 30*	+	1,24 ± 0,057	- -	14,76 ± 1,72
S 31	+	- -	10,79 ± 0,33	11,66 ± 3,13
S 32	+	- -	- -	13,06 ± 2,57
S 33*	+	1,31 ± 0,06	- -	19,27 ± 3,38
S 34	+	- -	- -	13,19 ± 0,24
S 35	+	- -	- -	5,49 ± 2,36
S 36	+	- -	- -	3,33 ± 0,70
S 37*	+	- -	- -	39,81 ± 2,43
S 38	+	- -	7,50 ± 0,30	8,55 ± 0,44

Continua...

S 39	+	- -	29,05 ± 2,81	5,22 ± 0,14
S 40	+	- -	11,20 ± 0,16	4,00 ± 0,59

*selecionada para o teste de promoção de crescimento de plantas. FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio, SFi: Solubilização de Fosfato inorgânico, EPS: Produção de Exopolissacarídeos, AIA: Produção de ácido indolacético.

Dos 40 isolados selecionados do solo rizosférico para avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento em plantas *in vitro*. 36 (90%) isolados foram capazes de fixar nitrogênio, apenas 12 (30%) dos isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio bibásico, 26 (65%) foram capazes de produzir EPS. Todos os isolados foram capazes de sintetizar AIA, utilizando o triptofano como precursor, variando entre 2,74 à 73,86 µg/mL, para os isolados R 77 e R 55, respectivamente. 23 (58%) isolados obtiveram uma produção de AIA entre 1 – 11 µg.mL⁻¹, enquanto 2 (5%) dos isolados produziram AIA > 50 µg.mL⁻¹ (Tabela 3, Figura 9), seguindo classificação de Kavamura, (2012).

Tabela 3: Característica de promoção de crescimento plantas *in vitro* dos isolados do solo rizosférico (R) cultivado com *A. mangium*.

Isolado	FBN	SFI	EPS	AIA
R 41*	+	- -	- -	26,34 ± 4,30
R 42	+	- -	15,19 ± 0,30	7,58 ± 0,20
R 43	+	- -	8,68 ± 0,52	4,59 ± 0,74
R 44	+	1,14 ± 0,04	- -	2,83 ± 0,55
R 45	+	1,23 ± 0,10	9,18 ± 0,34	7,15 ± 1,63
R 46	+	1,18 ± 0,08	8,87 ± 0,47	5,35 ± 1,53
R 47	+	1,26 ± 0,05	9,30 ± 0,76	16,39 ± 3,00
R 48	+	2,28 ± 0,18	10,90 ± 0,49	5,94 ± 1,49
R 49	+	2,03 ± 0,15	9,29 ± 0,89	4,54 ± 0,95
R 50	+	1,42 ± 0,17	- -	7,33 ± 2,96
R 51	+	- -	9,11 ± 0,20	7,78 ± 1,15
R 52*	+	- -	13,85 ± 0,54	20,22 ± 5,29
R 53	+	- -	7,98 ± 0,11	15,67 ± 0,77
R 54*	-	- -	- -	29,09 ± 6,05
R 55	+	1,72 ± 0,18	10,17 ± 0,55	73,86 ± 14,26

Continua...

R 56*	+	- -	12,64 ± 0,20	36,52 ± 7,97
R 57*	+	1,65 ± 0,11	9,80 ± 0,24	73,46 ± 14,12
R 58	+	- -	11,96 ± 0,51	3,32 ± 0,59
R 59	+	- -	8,85 ± 0,20	13,26 ± 0,88
R 60*	-	- -	- -	33,73 ± 5,07
R 61	+	1,39 ± 0,05	9,76 ± 0,62	10,42 ± 1,55
R 62	+	- -	- -	3,05 ± 0,23
R 63	+	- -	9,43 ± 0,60	4,20 ± 0,61
R 64	+	- -	- -	14,90 ± 1,35
R 65*	+	- -	10,15 ± 1,91	29,36 ± 8,56
R 66	-	- -	- -	8,32 ± 2,53
R 67*	+	- -	6,66 ± 0,06	16,70 ± 2,48
R 68	+	- -	- -	3,01 ± 0,34
R 69	+	- -	- -	3,46 ± 1,64
R 70	+	- -	- -	4,41 ± 0,70
R 71	+	1,49 ± 0,04	9,27 ± 0,19	12,24 ± 0,84
R 72	+	- -	8,62 ± 0,14	7,58 ± 0,34
R 73	+	1,00 ± 0,00	15,10 ± 1,14	9,81 ± 0,36
R 74*	+	- -	8,62 ± 0,12	19,63 ± 12,11
R 75	+	- -	23,96 ± 1,32	15,13 ± 6,26
R 76	+	- -	9,35 ± 0,59	12,11 ± 2,47
R 77	+	- -	- -	2,74 ± 0,08
R 78	+	- -	- -	10,28 ± 0,34
R 79	-	- -	12,06 ± 1,17	6,66 ± 1,42
R 80	+	- -	- -	10,58 ± 2,43

*selecionada para o teste de promoção de crescimento de plantas. FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio, SFi: Solubilização de Fosfato inorgânico, EPS: Produção de Exopolissacarídeos, AIA: Produção de ácido indolacético.

Dos 24 isolados endofíticos de raiz selecionados para avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento em plantas *in vitro*. 22 (92%) isolados foram capazes de fixar nitrogênio, 10 (42%) dos isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio bibásico, 22 (92%) foram capazes de produzir EPS. Todos isolados foram capazes de sintetizar AIA, utilizando o triptofano como precursor, variando entre 2,60 à 84,63 µg/mL, para os isolados E

101 e E 095, respectivamente. 5 (21%) isolados obtiveram uma produção de AIA entre 1 – 11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto 17 (71%) dos isolados produziram AIA 1 – 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 4, Figura 9), seguindo classificação de Kavamura, (2012).

Tabela 4: Característica de promoção de crescimento de plantas *in vitro* dos isolados endofíticos das raízes (E) obtido de *A. mangium*.

Isolado	FBN	SFi	EPS	AIA
E 081*	+	- -	10,04 $\pm$ 0,12	22,88 $\pm$ 2,42
E 082	-	- -	14,01 $\pm$ 0,54	19,36 $\pm$ 4,67
E 083*	+	- -	14,53 $\pm$ 0,42	35,85 $\pm$ 1,96
E 084	+	1,49 $\pm$ 0,14	10,18 $\pm$ 0,41	14,00 $\pm$ 1,29
E 085*	+	- -	- -	38,69 $\pm$ 3,45
E 086*	-	1,55 $\pm$ 0,13	11,41 $\pm$ 0,62	24,54 $\pm$ 4,33
E 087	+	1,51 $\pm$ 0,05	16,20 $\pm$ 1,51	13,19 $\pm$ 0,36
E 088	+	1,33 $\pm$ 0,09	8,18 $\pm$ 0,35	18,86 $\pm$ 1,06
E 089*	+	1,35 $\pm$ 0,18	15,59 $\pm$ 1,45	30,21 $\pm$ 2,76
E 090	+	1,35 $\pm$ 0,04	16,07 $\pm$ 0,19	2,83 $\pm$ 0,47
E 091	+	- -	- -	7,78 $\pm$ 0,82
E 092*	+	- -	8,85 $\pm$ 0,14	29,50 $\pm$ 3,32
E 093*	+	- -	16,49 $\pm$ 1,09	37,56 $\pm$ 3,18
E 094*	+	1,35 $\pm$ 0,04	15,00 $\pm$ 0,72	28,51 $\pm$ 1,10
E 095*	+	1,39 $\pm$ 0,10	13,37 $\pm$ 0,36	84,63 $\pm$ 11,05
E 096*	+	1,34 $\pm$ 0,08	12,91 $\pm$ 0,81	58,14 $\pm$ 1,96
E 097	+	- -	11,47 $\pm$ 0,98	18,68 $\pm$ 3,83
E 098	+	- -	14,56 $\pm$ 0,32	21,88 $\pm$ 4,06
E 099	+	- -	15,14 $\pm$ 0,78	19,86 $\pm$ 2,12
E 100	+	- -	14,83 $\pm$ 0,68	15,89 $\pm$ 2,22
E 101	+	- -	14,70 $\pm$ 0,03	2,60 $\pm$ 0,51
E 102	+	- -	11,52 $\pm$ 0,63	19,72 $\pm$ 5,01
E 103	+	- -	16,57 $\pm$ 0,33	2,69 $\pm$ 0,08
E 104	+	1,24 $\pm$ 0,06	11,05 $\pm$ 0,37	3,91 $\pm$ 1,56

*selecionada para o teste de promoção de crescimento de plantas. FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio, SFi: Solubilização de Fosfato inorgânico, EPS: Produção de Exopolissacarídeos, AIA: Produção de ácido indolacético.

Quando se observa a frequência relativa para FBN pelos isolados dos três ambientes estudados, constata-se um padrão semelhante entre os isolados da rizosfera e os endofíticos de raiz, os quais se sobressaem em relação ao ambiente solo não rizosférico (Figura 9). Este padrão ocorre pelo fato da fixação de nitrogênio requerer fontes de carbono e energia (NAHER et al. 2008), assim, os ambientes rizosférico e endofítico proporcionam as condições mais favoráveis para bactérias diazotróficas quando comparado ao ambiente não rizosférico.

As acácias são dependentes dos processos de fixação biológica de nitrogênio especialmente em solos pobres de nitrogênio (KLOCK et al., 2015) e quando precisa competir com outras espécies (PARKER; MALEK; PARKER, 2006) o que leva a uma maior abundância de organismos fixadores nas zonas da raiz, encontraram uma abundância de genes associados ao ciclo do nitrogênio quase duas vezes maior em solo rizosférico de acácia do que no solo não rizosférico.

Figura 9: Frequência relativa (%) da A) Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), B) Produção de Exopolissacarídeos (EPS), C) Solubilização de Fosfato inorgânico (SFi) por isolados bacterianos do solo não rizosférico (S), do solo rizosférico (R) e endofíticas de raiz (E), de plantas de *A. mangium*.

Tais padrões são esperados devido às pressões ambientais impostas, que aumentam a seleção dos organismos na rizosfera e no interior das raízes buscando característica funcionais desejáveis para a planta (MENDES et al., 2014; YANG, Yi et al., 2017). Além do que as bactérias presentes na rizosfera provêm do solo, e as endofíticas em sua maioria da rizosfera, sendo essa última, em geral, as mais prováveis de possuírem traços de promoção de crescimento (CHANWAY et al., 2000; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). Resumidamente, no solo, devido a maior diversidade, os traços de promoção de crescimento podem ser menores, visto que os organismos podem depender de outros processos presentes no solo enquanto na planta os traços de promoção de crescimento são essenciais, devido à menor diversidade e maior

seleção (FAN et al., 2018). É importante ressaltar que esse padrão encontrado para estes mecanismos citados, pode variar de acordo com os diferentes estádios fenológicos de cada planta de *A. mangium*, da época de amostragem e das condições ambientais, os quais contribuem substancialmente para os diferentes tipos e quantidades de exsudatos radiculares (WALIA et al., 2017).

No entanto, esse mesmo padrão não foi válido para a SFi e produção de EPS, o qual foi mais pronunciado para os endofíticos de raiz, seguidos pelos isolados rizosférico e por último os de solo não rizosférico (Figura 6). O fósforo está intimamente ligado com os fixadores de nitrogênio devido à quantidade requerida desse nutriente durante o processo de fixação (HUSSAIN, 2017), o que pode indicar esse aumento do grupo nas zonas das raízes acompanhando os fixadores. Plantações de acácia tiveram a maior produção de fosfatase ácida e valores similares no consórcio de plantios misto (*Acacia* sp. e *Eucalyptus* sp.) para a fosfatase ácida, indicando uma maior ciclagem de P nesses plantios (BINI et al., 2018), o que pode explicar a maior abundância de organismos que solubilizam fosfato nas zonas radiculares.

As maiores concentrações de produtores de EPS no solo rizosférico e endofíticos conferem características importantes para as bactérias, protegendo-as das injúrias ambientais, principalmente aumentando a agregação bacteriana (BURDMAN et al., 2000). Além disso, este mecanismo é essencial no processo da colonização radicular, pois auxilia na ligação da bactéria com a superfície radicular (RODRAGUEZ-NAVARRO; DARDANELLI; RUÍZ-SAINZ, 2007).

6.3. Seleção dos isolados para o teste de promoção de crescimento em mudas de *E. urograndis*

A produção de AIA foi o critério de seleção dos isolados para o teste de promoção de crescimento de plantas. Foram selecionados 10 isolados de cada ambiente que mais produziram esse fitohormônio e em seguida foram caracterizados molecularmente (Anexo 1). Muitos dos isolados selecionados também se mostraram promissores para os outros mecanismos avaliados (Tabela 5).

As bactérias são capazes de sintetizar e/ou regular os níveis de alguns hormônios vegetais (giberelinas, auxinas, citocininas, etileno, entre outros). O AIA é o hormônio mais citado na literatura relacionado à promoção de crescimento de plantas por bactérias, esta relação é estreita, e ocorre devido esta molécula atuar também, como sinalizadora, agindo como uma

forma de comunicação entre planta e micro-organismo (SPAEPEN, 2015; EGAMBERDIEVA et al., 2017; NAZIR; KAMILI; SHAH, 2018).

Na planta, as auxinas atuam em vários processos fisiológicos, participando desde processos celulares básicos, até importantes alterações morfológicas, diferenciação de tecidos, como o desenvolvimento de raízes, aumentando a absorção de nutrientes (SAUER et al., 2013), impactando diretamente na captação de nutrientes, favorecendo o crescimento vegetal (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

6.4. Caracterização molecular dos isolados selecionados

Para caracterização molecular os isolados foram selecionados conforme descrito no tópico 5.6. Com base na avaliação das sequências nucleotídicas do gênero 16S rRNA, houve o predomínio do gênero *Dyella* (S 08, S 30, S 33) entre as bactérias promotoras de crescimento de plantas obtidas do solo não rizosférico. Dentre as bactérias obtidas a partir do solo rizosférico, houve predomínio do gênero *Chryseobacterium* (R 55, R 56, R 57, R 60, R 65). Já para as bactérias endofíticas de raiz, o gênero predominante foi *Pseudomonas* (E 081, E 084, E 090, E 093, E 095, E 097). A maior percentagem de similaridade foi obtida para o isolado E 095 (99 %) com a bactéria *Pseudomonas koreensis* (NR 025228.1). Enquanto a menor percentagem de similaridade foi obtida por R 74 (94,18 %) com a bactéria *Pseudomonas* (NR 043935.1), classificando-a assim apenas a nível de gênero. Os isolados que apresentam percentagem de similaridade inferior a 98,7 % poderiam definir uma nova espécie bacteriana (STACKEBRANDT; EBERS, 2006).

Tabela 5: Classificação taxonômica através do sequenciamento do 16S rRNA dos 10 isolados selecionados de cada ambiente, solo não rizosférico (S), solo rizosférico (R) e endofítico de raiz (E), devido à maior produção de AIA.

Isolados	Similaridade BLAST	Query Cover	Per. Ident	Nº Acesso
S 03	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i>	94 %	98,21 %	NR 114270.1
S 08	<i>Dyella jiangningensis</i>	90 %	98,72 %	NR 121724.1
S 10	<i>Chitinophaga eiseniae</i>	95 %	96,61 %	NR 116796 .1
S 16	<i>Paenibacillus susongensis</i>	93%	97,74 %	NR 134118.1
S 17	<i>Mesorhizobium soli</i>	94 %	97,37 %	NR 145552.1

Continua...

S 25	<i>Bacillus wiedmanni</i>	94 %	98,27 %	NR 152692.1
S 28	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	96 %	98,18 %	NR 040893.1
S 30	<i>Dyella jiangningensis</i>	92 %	98,75 %	NR 121724.1
S 33	<i>Dyella terrae</i>	86 %	98,00 %	NR 044540.1
S 37	<i>Burkholderia</i>	91 %	97,59 %	NR 042633.1
R 41	<i>Enterobacter</i>	95 %	96,98 %	NR 024640.1
R 52	<i>Bacillus soli</i>	95 %	98,50 %	NR 025591.1
R 54	<i>Burkholderia</i>	91 %	97,96 %	NR 042633.1
R 55	<i>Chryseobacterium</i>	93 %	97,35 %	NR 126256.1
R 56	<i>Chryseobacterium</i>	94 %	97,00 %	NR 126256.1
R 57	<i>Chryseobacterium</i>	95 %	97,38 %	NR 126256.1
R 60	<i>Chryseobacterium lactis</i>	94 %	98,15 %	NR 126256.1
R 65	<i>Chryseobacterium</i>	95 %	97,59 %	NR 126256.1
R 67	<i>Paraburkholderia</i>	94 %	97,22 %	NR 169402.1
R 74	<i>Pseudomonas</i>	83 %	94,18 %	NR 043935.1
E 081	<i>Pseudomonas</i>	97 %	97,41 %	NR 025228.1
E 083	<i>Pseudomonas</i>	86 %	96,67 %	NR 042541.1
E 085	<i>Yokenella regensburgei</i>	90 %	98,40 %	NR 104934.1
E 086	<i>Pseudomonas</i>	90 %	97,49 %	NR 025228.1
E 089	<i>Pseudomonas koreensis</i>	97 %	98,05 %	NR 025228.1
E 092	<i>Pseudomonas koreensis</i>	91 %	98,25 %	NR 025228.1
E 093	<i>Bacillus mobilis</i>	96 %	98,52 %	NR 157731.1
E 094	<i>Pseudomonas koreensis</i>	98 %	99,00 %	NR 025228.1
E 095	<i>Bacillus</i>	93 %	97,49 %	NR 115526.1
E 096	<i>Pseudomonas koreensis</i>	93 %	98,10 %	NR 025228.1

6.5. Teste de promoção de crescimento em mudas de *E. urograndis* para selecionar os isolados para compor o consórcio bacteriano.

No teste de promoção de crescimento, as mudas de *E. urograndis* foram avaliadas quanto às características do sistema radicular (Figura 8), comprimento da parte aérea, diâmetro do

colete e a massa da matéria seca da parte aérea. Não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos para o teste de enraizamento (Tabela 6).

O teste de promoção de crescimento possibilitou selecionar um isolado potencial de cada ambiente S 33 (*Dyella*), R 55 (*Chryseobacterium*) e E 081 (*Pseudomonas*), estes foram utilizados para formar o consórcio bacteriano avaliado no experimento seguinte, descrito no tópico anterior (tópico 6.6).

Por não haver diferenças visuais e estatísticas na promoção de crescimento das mudas de *E. urograndis* com a inoculação dos isolados, elaborou-se uma abordagem multivariada (Figura 10), vislumbrando a seleção de isolados representativos de cada ambiente. A representatividade foi tomada como sendo a contribuição individual que cada isolado possuía quando se analisou as variáveis com resultados mais expressivos (diâmetro médio do colo, matéria seca da raiz e área superficial da raiz) e a respectiva correlação destes com o parâmetro de maior contribuição (Tabela 9). A variável que apresentou maior contribuição, considerando o somatório das duas primeiras componentes (ACP1 + ACP2), foi a área superficial (Tabela 6, 7) e, por esse motivo, os isolados selecionados de cada ambiente foram os mais correlacionados com esta variável. Além disso, a área superficial foi significativamente correlacionada de forma positiva com a matéria seca, ou seja, dois dos principais atributos de maior interesse (Tabela 8).

Tabela 6: Contribuição individual do resíduo da análise de componentes principais (ACP).

Ambiente	Bactéria_ID	ACP 1	ACP 2	ACP 3
Solo	S 03	2,31E+00	0,07425146	20,16088045
Solo	S 08	6,19E-01	2,75649669	0,059941764
Solo	S 10	2,67E+00	0,34453661	0,05638932
Solo	S 16	1,19E+00	0,23472837	0,051975834
Solo	S 17	3,50E-02	4,95568817	0,389997937
Solo	S 25	1,45E+00	3,38325372	0,003451225
Solo	S 28	2,95E+00	1,49787083	0,202160799
Solo	S 30	1,74E+01	4,36290383	8,425888844
Solo	S 33	2,68E+00	1,88693469	0,181171571
Solo	S 37	8,58E-02	0,65314774	25,63847226
Continua...				

Rizosfera	R 41	5,02E+00	0,7740856	0,010376362
Rizosfera	R 52	1,73E+00	0,95135035	2,507782084
Rizosfera	R 54	1,83E+00	3,09906033	0,859127559
Rizosfera	R 55	4,37E+00	1,20701191	0,002265876
Rizosfera	R 56	2,36E+01	2,98348000	0,611647389
Rizosfera	R 57	9,94E+00	3,66357125	16,97823115
Rizosfera	R 60	1,16E-01	0,18310499	0,148389667
Rizosfera	R 65	9,68E+00	0,01165591	14,57360846
Rizosfera	R 67	2,81E-01	14,71660451	1,164171849
Rizosfera	R 74	3,58E+00	1,6910026	0,698569614
Endofítico	E 81	2,03E+00	1,9670479	1,06449447
Endofítico	E 84	1,29E-01	4,42925585	0,539843638
Endofítico	E 86	6,90E-01	3,30802627	1,55062309
Endofítico	E 87	6,84E-02	4,33990531	0,001133179
Endofítico	E 90	6,76E-02	1,8762273	0,341502621
Endofítico	E 93	1,93E+00	24,1287124	0,385186529
Endofítico	E 94	8,95E-01	6,89403326	0,851923763
Endofítico	E 95	8,31E-06	2,24409753	0,459411163
Endofítico	E 96	1,75E+00	0,52301792	0,451035893
Endofítico	E 97	8,58E-01	0,85893669	1,630345649

Tabela 7: Contribuição das variáveis analisadas na análise de componentes principais (ACP).

	ACP 1	ACP 2	ACP 3
Área superficial	47,755741	6,888498	45,35576
Diâmetro médio	1,291503	32,085028	6,623469
MS raiz	40,952756	1,026473	48,020771

MS raiz: massa da matéria seca da raiz

Tabela 8: Correlação de Pearson entre as variáveis analisadas na análise de componentes principais (ACP).

	Área superficial	Diâmetro médio	MS raiz
Área superficial	1,00		
Diâmetro médio	-0,07 ^{ns}	1,00	
MS raiz	0,54**	0,15 ^{ns}	1,00

ns: não significativo, **: $p \leq 0,01$

Abordagem similar foi utilizada por Yang et al. (2020) ao selecionar como variável composta de representação da comunidade bacteriana o primeiro eixo de explicação de uma análise multivariada (NMDS). Esta abordagem é baseada em estudos ecológicos que visam a representatividade de variáveis compostas, como a estrutura da comunidade microbiana, apresentando um potencial biotecnológico para tomada de decisão por permitir o melhor entendimento individual de uma amostra perante a análise integrada (LING et al., 2017).

Figura 10: Diagramação da análise de componentes principais (ACP) obtida com o resultado do teste de promoção de crescimento das mudas de *E. urograndis* inoculadas com diferentes bactérias. A elipse vermelha compreende as bactérias selecionadas dos três ambientes para compor o consórcio bacteriano.

Tabela 9: Parâmetros avaliados no teste de promoção de crescimento de mudas de *E. urograndis* submetidas a inoculação com diferentes isolados bacterianos oriundos do solo não rizosférico (S), do solo rizosférico (R) e endofíticos de raiz (E).

Trat	CPA (cm)	Ø Coleto (mm)	Ø Raiz (mm)	MSPA(g)	MSR (g)	ASR (cm ²)
S03	8,2 ± 1,34	1,6 ± 0,12	0,6 ± 0,23	0,2 ± 0,05	0,03 ± 0,01	9,79 ± 8,64
S08	6,9 ± 0,63	1,7 ± 0,26	0,7 ± 0,26	0,2 ± 0,05	0,06 ± 0,02	14,2 ± 5,38
S10	7,2 ± 0,80	1,6 ± 0,12	0,4 ± 0,05	0,2 ± 0,08	0,06 ± 0,01	24,6 ± 7,77

Continua...

S16	7	± 0,31	1,7	± 0,20	0,5	± 0,10	0,1	± 0,03	0,07	± 0,02	19,9	± 14,50
S17	5,2	± 3,03	1,3	± 0,75	0,8	± 0,60	0,1	± 0,07	0,05	± 0,03	5,17	± 3,35
S25	7,7	± 0,26	1,9	± 0,31	0,6	± 0,21	0,2	± 0,03	0,07	± 0,03	23,5	± 14,83
S28	8,3	± 1,02	1,9	± 0,25	0,6	± 0,22	0,1	± 0,04	0,06	± 0,01	22,4	± 14,84
S30	7,4	± 4,17	1,6	± 0,88	0,3	± 0,19	0,2	± 0,10	0,03	± 0,03	19,5	± 17,97
S33*	7,3	± 1,08	1,6	± 0,33	0,5	± 0,14	0,1	± 0,05	0,06	± 0,01	25,1	± 9,10
S37	8,1	± 0,60	1,7	± 0,16	0,4	± 0,03	0,2	± 0,05	0,08	± 0,02	30,6	± 14,12
R41	8,1	± 0,77	1,7	± 0,20	0,4	± 0,02	0,1	± 0,06	0,07	± 0,03	28,9	± 9,70
R52	8,6	± 0,79	1,7	± 0,28	0,9	± 0,53	0,2	± 0,10	0,07	± 0,03	19,8	± 15,88
R54	7,8	± 0,67	1,6	± 0,24	0,4	± 0,04	0,2	± 0,06	0,07	± 0,02	27,5	± 14,12
R55*	7,7	± 1,02	1,5	± 0,23	0,5	± 0,14	0,1	± 0,05	0,04	± 0,02	14,8	± 6,58
R56	6,2	± 0,36	2	± 0,20	1	± 0,46	0,2	± 0,01	0,04	± 0,01	10,2	± 6,64
R57	7,4	± 1,03	1,7	± 0,10	0,6	± 0,19	0,1	± 0,03	0,05	± 0,02	17,5	± 13,68
R60	4,2	± 0,85	1,3	± 0,19	1	± 0,53	0,1	± 0,07	0,03	± 0,02	5,95	± 3,35
R65	4,1	± 0,71	1,1	± 0,31	0,3	± 0,34	0,1	± 0,02	0,02	± 0,02	8,23	± 8,42
R67	4,2	± 2,56	1,3	± 0,75	0,5	± 0,48	0,1	± 0,08	0,05	± 0,03	16,6	± 14,37
R74	4,1	± 0,64	1,4	± 0,24	0,5	± 0,16	0,1	± 0,08	0,06	± 0,02	23	± 15,16
E81*	5,4	± 0,65	1,5	± 0,26	0,6	± 0,32	0,2	± 0,10	0,07	± 0,03	22,6	± 12,87
E84	4,3	± 0,68	1,4	± 0,41	0,9	± 0,40	0,2	± 0,06	0,05	± 0,02	13,7	± 12,51
E86	4,6	± 1,32	1,3	± 0,12	0,7	± 0,34	0,1	± 0,04	0,04	± 0,02	14	± 9,94
E87	3,8	± 2,10	1,3	± 0,73	0,4	± 0,28	0,1	± 0,09	0,04	± 0,03	12,9	± 10,44
E90	5,1	± 1,30	1,7	± 0,25	0,7	± 0,28	0,2	± 0,07	0,05	± 0,02	18,5	± 16,11
E93	4,7	± 0,58	1,3	± 0,23	1	± 0,47	0,1	± 0,01	0,04	± 0,01	10,8	± 10,35
E94	5,8	± 0,70	1,4	± 0,30	0,4	± 0,06	0,1	± 0,03	0,04	± 0,02	20,7	± 10,58
E95	5,0	± 1,68	1,1	± 0,29	0,3	± 0,20	0,1	± 0,04	0,04	± 0,03	15,5	± 14,09
E96	5,9	± 0,67	1,5	± 0,18	0,6	± 0,18	0,1	± 0,10	0,04	± 0,02	12,5	± 8,91
E97	4,7	± 0,88	1,4	± 0,34	0,5	± 0,15	0,1	± 0,06	0,06	± 0,02	20,9	± 13,31
C 1	3,9	± 2,19	1,4	± 0,81	0,4	± 0,26	0,1	± 0,05	0,04	± 0,03	14,1	± 13,33
C 2	2,9	± 2,81	0,9	± 0,84	0,5	± 0,50	0	± 0,03	0,02	± 0,02	1,82	± 2,08

*selecionadas para a formulação do consórcio bacteriano de acordo com o critério multivariado de contribuição. Não houve diferenças significativas (Tukey a 5%) entre os isolados para todos os parâmetros avaliadas.

Legenda: Trat= tratamento, CPA = comprimento da parte aérea, MSPA = massa da matéria seca da parte aérea, MSR = massa da matéria seca da raiz, ASR = área superficial radicular.

Figura 11: Representação das imagens de raízes das mudas de *E. urograndis*, geradas pelo método Scanner, através do software WinRHIZO®.

6.6. Avaliação da eficiência do consórcio bacteriano na promoção de crescimento de mudas de *E. urograndis*

Foi verificado que a área superficial foliar obtida pelo tratamento sob efeito isolado da bactéria endofítica (P) foi superior ($p < 0,05$), ao tratamento que recebeu o consórcio e apenas 50 % da adubação (DCP 50%) e aos tratamentos testemunhas (sem inoculação) (T, T 50% e T A), (Tabela 10, Figura 12, 13). No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros como massa da matéria seca da raiz, diâmetro médio da raiz e área superficial radicular. Isso pode ser uma decorrência do volume dos tubetes promoverem uma limitação do crescimento radicular, o que impede uma acurada percepção de diferenças nestas variáveis (VARGAS et al., 2011) (Tabela 10)

Apesar da inexistência de diferenças significativas entre os tratamentos inoculados (DCP, DC, DP, CP, D, C, DCP 50% e DCP A) dos controles (T, T 50% e DCP A), algumas observações devem ser levadas em consideração. É possível observar que a área superficial foliar dos tratamentos inoculados, foram superiores a 70 cm², enquanto os tratamentos testemunhas foram inferiores, indicando uma tendência de contribuição da inoculação. Outro ponto importante a ser destacado, é o efeito da inoculação no tratamento com 50% de adubação (DCP 50%) o qual obteve área superficial foliar de 68, 72 cm², enquanto o controle que recebeu apenas 50% de adubação (T 50%), obteve área superficial foliar de 59,17 cm², podendo a inoculação contribuir para diminuição do efeito de desequilíbrio da adubação (Tabela 10).

Figura 12: Representação das imagens de folhas de (A e B) escaneadas, e raízes (C e D) das mudas de *E. urograndis*, geradas pelo método Scanner, através do software WinRHIZO®.

O uso do consórcio bacteriano composto pelas estirpes selecionadas se mostrou eficiente quanto à promoção do crescimento das mudas de *E. urograndis*. Em linhas gerais, a maior eficiência foi observada com o uso de *Pseudomonas* oriunda do ambiente endofítico de raiz (P). Isso demonstra que a utilização da cepa *Pseudomonas* endofítica para programas de inoculação de mudas de *E. urograndis* é mais promissora do que as cepas rizosféricas e não rizosféricas, sobretudo na fase inicial de desenvolvimento, a qual compreende o período avaliado neste estudo.

As *Pseudomonas* spp. pertencem ao grupo de bactérias gram-negativas não formadoras esporos. São comumente encontradas em solo rizosférico de diferentes plantas. Estas bactérias se destacam pela versatilidade no uso de substratos como nutriente, conseguindo assim sobreviver em condições de solo que seriam estressantes para outras bactérias (SANTOYO; OROZCO-MOSQUEDA; GOVINDAPPA, 2012). Esse gênero é encontrado com predominância entre todos os micro-organismos que habitam a rizosfera, isso por que os indivíduos que compõem este gênero são capazes de colonizar os órgãos das plantas, como raízes e tubérculos, além de utilizar exsudatos radiculares e produzir uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos a fungos e bactérias fitopatogênicos (VIEIRA JUNIOR et al., 2013).

Figura 13: Mudanças de *E. urograndis* 80 dias após estaqueamento em tubetes.

Legenda: D = presença da bactéria do ambiente solo (*Dyella*), C = presença da bactéria do ambiente rizosfera (*Chryseobacterium*), P = presença da bactéria do ambiente endofítico (*Pseudomonas*), T = testemunha (sem inoculante), 50% = condição de 50% da adubação, A = condição de substrato autoclavado.

Bactérias endofíticas também foram capazes de promover crescimento em mudas de *E. urograndis* em pesquisa realizada por Paz et al. (2012), que obtiveram parâmetros como índice de enraizamento com resultado de 96,2% em mudas inoculadas, enquanto para mudas não inoculadas o valor foi de 89,4 %. O efeito de endofíticas também foi observado em mudas de *Pinus*, onde uma bactéria do gênero *Pantoea* promoveu ganhos de 19,3; 26,3 e 151%, no diâmetro do coleto e peso da matéria seca da parte aérea e raiz, respectivamente, quando comparados ao controle (SONG et al., 2020).

Na literatura, *Pseudomonas* é frequentemente relatada como promotora de crescimento plantas em diversas espécies. Conforme reportado por Gamez et al. (2019), a inoculação de *Pseudomonas fluorescens* em mudas de bananeira promoveu ganho em área foliar. Em pesquisa em que foi realizado isolamento e reinoculação de bactérias endofíticas a partir de *Sophora alopecuroides*, uma leguminosa herbácea de ambiente árido, encontraram bactérias que se alinharam à espécie *Pseudomonas chlororaphis* e foi demonstrado que os tratamentos que receberam estas bactérias foram superiores em todos os parâmetro (comprimento parte aérea e raiz, massa da matéria seca da parte aérea e raiz e nodulação), no entanto, diferente do estudo em questão, as bactérias quando em consórcio, foram superiores ao efeito quando isoladas (ZHAO et al., 2013).

É importante ressaltar que a interação microrganismo-planta pode variar com a variedade vegetal. Teixeira et al. (2007) avaliaram combinações de bactérias promotoras de crescimento de plantas com diferentes clones de *Eucalyptus* sp. e os resultados foram variados, mostrando que microrganismos que são eficientes para um determinado clone, podem não ter o mesmo efeito quando utilizados em clone distinto. No entanto, é válido destacar que todos os tratamentos inoculados do trabalho supracitado, foram superiores no quesito enraizamento quando comparados ao tratamento sem inoculante.

Tabela 10: Efeito da inoculação dos nas mudas de *E. urograndis*

Trat	CPA (cm)	Ø Coleto (mm)	Ø Raiz (mm)	MSPA (g)	MSR (g)	ASR (cm ²)	ASF (cm ²)
DCP	18,93 ± 1,60	2,03 ± 0,18	0,28 ± 0,02	0,60 ± 0,17	0,20 ± 0,04	129,32 ± 18,83	78,05 ± 16,73 ab
DC	18,40 ± 1,67	2,10 ± 0,14	0,27 ± 0,01	0,60 ± 0,14	0,16 ± 0,03	133,96 ± 14,59	73,51 ± 15,19 ab
DP	17,89 ± 2,85	2,08 ± 0,32	0,28 ± 0,02	0,57 ± 0,30	0,24 ± 0,07	128,48 ± 22,92	73,02 ± 21,49 ab
CP	17,71 ± 1,61	1,94 ± 0,09	0,32 ± 0,04	0,64 ± 0,13	0,19 ± 0,04	137,86 ± 18,74	71,78 ± 12,70 ab
D	17,29 ± 2,63	1,93 ± 0,26	0,31 ± 0,04	0,66 ± 0,23	0,20 ± 0,04	149,86 ± 15,78	78,99 ± 17,00 ab
C	16,63 ± 1,62	2,02 ± 0,25	0,27 ± 0,02	0,77 ± 0,16	0,22 ± 0,02	148,16 ± 10,58	81,22 ± 14,09 ab
P	19,00 ± 1,28	2,13 ± 0,21	0,27 ± 0,02	0,73 ± 0,23	0,27 ± 0,05	144,93 ± 15,94	101,46 ± 22,09 a
T	16,16 ± 2,67	1,71 ± 0,24	0,27 ± 0,02	0,48 ± 0,18	0,22 ± 0,07	150,86 ± 14,95	64,03 ± 18,07 b
DCP 50%	18,18 ± 1,51	1,95 ± 0,12	0,27 ± 0,01	0,51 ± 0,16	0,20 ± 0,05	122,82 ± 22,24	68,72 ± 21,58 b
T 50%	16,48 ± 1,30	1,64 ± 0,10	0,25 ± 0,02	0,47 ± 0,10	0,18 ± 0,03	135,89 ± 12,03	59,17 ± 11,58 b
DCP A	19,51 ± 0,10	2,02 ± 0,08	0,28 ± 0,01	0,70 ± 0,12	0,24 ± 0,03	159,41 ± 15,88	92,19 ± 17,61ab
T A	17,91 ± 1,39	1,77 ± 0,19	0,26 ± 0,01	0,64 ± 0,17	0,20 ± 0,04	161,43 ± 25,25	69,07 ± 16,25 b

Médias ± desvio padrões com letras ausentes não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$), enquanto as médias ± desvio padrões seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Legenda: Trat= tratamento, CPA = comprimento da parte aérea, MSPA = massa da matéria seca da parte aérea, MSR = massa da matéria seca da raiz, ASR = área superficial radicular, ASF= área superficial foliar, D = presença da bactéria do ambiente solo (*Dyella*), C = presença da bactéria do ambiente rizosfera (*Chryseobacterium*), P = presença da bactéria do ambiente endofítico (*Pseudomonas*), T = testemunha (sem inoculante), 50% = condição de 50% da adubação, A = condição de substrato autoclavado..

7. CONCLUSÕES

- O ambiente solo não rizosférico e rizosférico apresentam maior número de populações bacterianas (UFC.g⁻¹) quando comparado ao ambiente endofítico;
- Os isolados obtidos da *A. mangium* apresentam potencial biotecnológico de promoção de crescimento de plantas *in vitro* e *in vivo*, confirmando a primeira hipótese;
- O ambiente endofítico de raiz da *A. mangium* possui bactérias com maior potencial de promoção de crescimento de plantas;
- Dentre os isolados testados, a inoculação com *Pseudomonas* foi a mais promissora, em termos de promoção de crescimento das mudas de *E. urograndis*.
- Os tratamentos que receberam inóculo (consórcio ou não) mostraram-se promissores na promoção de crescimento vegetal das mudas de *E. urograndis* em relação aos controles (sem inóculo), no entanto estudos mais aprofundados se faz necessário para confirmar tais resultados;
- O consórcio bacteriano composto por *Dyella* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., mostrou potencial para promoção de crescimento de mudas de *E. urograndis*, podendo suprir déficit de nutriente, no entanto, o consórcio foi menos eficiente que o efeito isolado da bactéria *Pseudomonas*, rejeitando a segunda hipótese.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. **Anuário Estatístico-Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas**. Anuário Estatístico ABRAF, p. 146, 2013.
- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. **Increased plant uptake of nitrogen from ¹⁵N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria**. *Applied Soil Ecology*, v. 46, n. 1, p. 54–58, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.06.010>>.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. **Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan**. *Turkish Journal of Biology*, v. 29, n. 1, p. 29–34, 2005.
- ALMEIDA, M. R. de et al. **Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings**. *Trees - Structure and Function*, v. 31, n. 5, p. 1377–1390, 2017.
- ALVARES, C. A. et al. **Köppen's climate classification map for Brazil**. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.
- ANDRADE, G. M. de; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. **Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp.** *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 5, p. 465–476, 2003.
- ANDREOTE, F. D.; SILVA, M. de C. P. E. **Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture**. *ScienceDirect*, v. 37, p. 29–34, 2017.
- BARBOSA, J. G. **Enraizamento de estacas de rosa sp. sob a inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal**. 2017. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.
- BASHAN, Y. et al. **Restoration of eroded soil in the Sonora Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water**. *Genes & Diseases*, 2012.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. **Bacteria / Plant growth-promotion**. In: *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier ed. [s.l.: s.n.]1p. 103–115.
- BATISTA, B. D. et al. **Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability**. *Microbiological Research*, v. 206, p. 33–42, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29146258/>>. Acesso em: 21 jan. 2021.

BEAUREGARD, P. B. Chapter One - **Not Just Sweet Talkers: How Roots Stimulate Their Colonization by Beneficial Bacteria**. In: BAIS, H.; SHERRIER, J. (Ed.). *Plant Microbe Interactions. Advances in Botanical Research*. [s.l.] Academic Press, 2015. 75p. 1–20.

BERG, G. et al. **The plant microbiome explored: Implications for experimental botany**. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, n. 4, p. 995–1002, 2016.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. **Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture**. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 28, n. 1327–1350, 2012.

BINI, D. et al. ***Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations: Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development**. *Applied Soil Ecology*, v. 63, p. 57–66, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139312002351>>.

BINI, D. et al. **Intercropping *Acacia mangium* stimulates AMF colonization and soil phosphate activity in *Eucalyptus grandis***. *Sci. Agric.*, v. 75, n. 2, p. 102–110, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0337>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

BULGARELLI, D. et al. **Structure and functions of the bacterial microbiota of plants**. *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, p. 807–838, 2013.

BURDMAN, S. et al. **Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation**. *FEMS Microbiology Letters*, v. 189, n. 2, p. 259–264, 1 ago. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09240.x>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

CATIE. *Acacia mangium* Willd. **Especie de uso múltiple en América Central**. Turrialba, 1992. .

CARDOSO, E.J.B.N., ESTRADA-BONILLA, G.A. **Inoculantes agrícolas**. In: LIMA, U. de A. *Biotecnologia Industrial*. vol. 3 - Processos Fermentativos e Enzimáticos. 2a Ed. 2019.

CHANWAY, C. P. et al. **Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria**. *Forest Ecology and Management*, v. 133, n. 1–2, p. 81–88, 1 ago. 2000.

CHEN, L. et al. **Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils.** Applied Soil Ecology, v. 46, n. 3, p. 383–389, 1 nov. 2010.

CHEN, Y. P. et al. **Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities.** Applied Soil Ecology, v. 34, n. 1, p. 33–41, 1 nov. 2006.

CIB. **CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.celso-foelkel.com.br>>. Acesso em: 23 out. 2018.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. **Plant growth-promoting bacteria in the rhizo - and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization Soil.** Biology and Biochemistry Pergamon, , 1 maio 2010.

CORRÊA, L. da R.; FETT-NETO, A. G. **Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill.** Journal of Thermal Biology, v. 29, n. 6, p. 315–324, 2004.

COUNCIL, N. R. **Firewood Crops: Shrub and Tree Species for Energy Production.** The Nation ed. [s.l: s.n.]

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa.** Embrapa Agrobiologia Seropédica - RJ, 1999. .

DONG, X. et al. **Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil.** International Biodeterioration and Biodegradation, v. 62, n. 3, p. 257–262, 1 out. 2008.

EMBRAPA FLORESTAS. **Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda.** 1. ed. [s.l: s.n.]

FAN, K. et al. **Wheat rhizosphere harbors a less complex and more stable microbial co-occurrence pattern than bulk soil.** Soil Biology and Biochemistry, v. 125, p. 251–260, 1 out. 2018.

FILHO, O. F.; MATHIAS, B.; NETO, J. P. de C. **Fatores que influenciam na produção de mudas de eucalipto por miniestaquia.** Conexão Eletrônica, v. 15, p. 983–991, 2018.

FOELKEL, C. **Os Eucaliptos e as Leguminosas: Parte 03: *Acacia mangium*.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.celso-foelkel.com.brwww.eucalyptus.com.brwww.abtcp.org.br>. Acesso em: 23 out. 2018.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. ***Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation**. AMB Express, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

GAMEZ, R. et al. **Contents lists available at Science Direct Microbiological Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (Musa acuminata Colla)**. Microbiological Research, v. 220, p. 12–20, 2019.

GLICK, B. R. **Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications**. Scientifica, v. 2012, p. 15, 2012.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. **A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria**. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://aem.asm.org/>>. Acesso em: 4 nov. 2018.

GONÇALVES, J. L. de M. et al. **Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations**. Forest Ecology and Management, v. 301, p. 6–27, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2012.12.030>>.

GONÇALVES, J. L. de M. et al. **Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations**. Forest Ecology and Management, v. 301, p. 6–27, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2012.12.030>>.

GOUDA, S. et al. **Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture**. Microbiological Research, 2018. .

GUMIERE, T. et al. **Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) and SlashPine (*Pinus elliottii*)**. Antonie van Leeuwenhoek, v. 105, p. 663–669, 2014.

HAASE, D. L. **Understanding forest seedling quality: measurements and interpretation**. Tree Planters' Notes, v. 52, n. 2, p. 24–30, 2008. Disponível em: <http://forestseedlingnetwork.com/media/15912/Understanding_Forest_Seedling_Quality_-_Measurements_and_Interpretation.pdf>.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. de. **Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas**. Acta Amazonica, v. 34.2, p. 343–357, 2004. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672004000300002&script=sci_abstract>.

HEGDE, M.; PALANISAMY, K.; YI, J. S. *Acacia mangium* Willd. - **A Fast Growing Tree for Tropical Plantation**. Journal of Forest and Environmental Science, v. 29, n. 1, p. 1–14, 2013. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=SRGHBV&py=2013&vnc=v29n1&sp=1>>.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil**. CALIFORNIA AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION, v. 347, p. 29–31, 1950.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. **Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis?** In: BRUIJN, F. J. DE (Ed.). Biological Nitrogen Fixation. [s.l: s.n.]2p. 1009–1023.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. **Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp . and *Azospirillum brasilense* : A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability**. American Journal of Plant Sciences, v. 6, n. April, p. 811–817, 2015.

HUSSAIN, R. M. **The Effect of Phosphorus in Nitrogen Fixation in Legumes**. Agricultural Research & Technology: Open Access Journal, v. 5, n. 1, p. 3, 2017.

IBÁ. **Indústria Brasileira de Árvores**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf>. Acesso em: 16 set. 2018.

JIMÉNEZ, K. B.; MCCOY, C. B.; ACHÍ, R. **Detection of Shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 4, p. 993–1000, 2010.

JOERGENSEN, R. G. **Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils**. Soil Biology & Biochemistry, v.32, p.647-652, 2000.

JUNIOR, G. de F.; CORCORANE, M. **A história ambiental dos eucaliptos: Austrália, Brasil e Vale do Paraíba Paulista** " [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Eucalyptus_distribution_maps>. Acesso em: 23 out. 2018.

KAMUTANDO, C. N. et al. **The Functional Potential of the Rhizospheric Microbiome of an Invasive Tree Species, *Acacia dealbata***. *Soil Microbiology*, v. 77, p. 191–200, 2018.

KANG, S. M. et al. **Indole-3-acetic-acid and ACC deaminase producing *Leclercia adecarboxylata* MO1 improves *Solanum lycopersicum* L. growth and salinity stress tolerance by endogenous secondary metabolites regulation**. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019.

KASSAMBARA, A; MUNDT, F. **Package ‘factoextra’**. Extract and visualize the results of multivariate data analyses, v. 76, 2017.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga : promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**, 2012. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

KAVAMURA, V. N. et al. **Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought**. *Microbiological Research*, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013.

KLOCK, M. M. et al. **Host promiscuity in symbiont associations can influence exotic legume establishment and colonization of novel ranges**. *Diversity and Distributions*, v. 21, n. 10, p. 1193–1203, 2015.

KOUTIKA, L. S. et al. **Changes in N and C concentrations, soil acidity and P availability in tropical mixed acacia and eucalypt plantations on a nutrient-poor sandy soil**. *Plant and Soil*, v. 379, n. 1–2, p. 205–216, 2014.

LACLAU, J. P. et al. **Biogeochemical cycles of nutrients in tropical *Eucalyptus* plantations. Main features shown by intensive monitoring in Congo and Brazil**. *Forest Ecology and Management*, v. 259, n. 9, p. 1771–1785, 2010.

LACLAU, J.-P. et al. **Dynamics of soil exploration by fine roots down to a depth of 10 m throughout the entire rotation in *Eucalyptus grandis* plantations**. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. July, p. 1–12, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2013.00243/abstract>>.

LANE, D.J. (1991) **16S/23S rRNA Sequencing**. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, New York, 115-175

LÊ, Sébastien et al. **FactoMineR: an R package for multivariate analysis**. *Journal of statistical software*, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

- LIMA, D. R. M. De. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. 2012. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.
- LING, N. et al. **Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs a semi-arid steppe**. *Geoderma*, v. 292, p. 25–33, 2017.
- LIU, H. et al. **Effects of jasmonic acid signalling on the wheat microbiome differ between body sites**. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep41766>>.
- LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. **Applications of freeliving plant growth-promoting rhizobacteria**. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 86, n. 1, p. 1–25, 2004.
- MAFIA, R. G. et al. **Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas**. *Revista Árvore*, v. 29, n. 6, p. 843–851, 2005.
- MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P. **Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils?** *Microbiological Research*, v. 169, n. 5–6, p. 337–347, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>>.
- MENDES, L. W. et al. **Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere**. *ISME Journal*, v. 8, n. 8, p. 1577–1587, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24553468/>>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- MENDIBURU, F. De. **Statistical Procedures for Agricultural Research**, 2020. . Disponível em: <<http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fmendiburu>>.
- NAZIR, N.; KAMILI, A. N.; SHAH, D. **Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth – A Review**. *International Journal of Management, Technology and Engineering*, v. 8, n. 7, p. 709–721, 2018.
- NEUBAUER, U. et al. **Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B**. *Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 13, p. 2749–2755, 2000.
- NWIGWE, C. S. **Root-enhancing properties of rhizospheric bacteria on *Eucalyptus* hybrid cuttings**. 2018. Faculty of Health and Environmental Sciences, 2018.
- OLIVEIRA, L. S. De et al. **Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*** Rooting of

mini-cuttings and micro-cuttings of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. Scientia Florestalis, v. 40, n. 96, p. 507–516, 2012.

ONGENA, M.; JACQUES, P. ***Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol***. Trends in Microbiology, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

OTEÍNO, N. et al. **Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates**. Frontiers in Microbiology, v. 6, p. 9, 2015.

PANDEY, A.; YARZÁBAL, L. A. **Bioprospecting cold-adapted plant growth promoting microorganisms from mountain environments**. p. 643–657, 2019.

PARKER, M. A.; MALEK, W.; PARKER, I. M. **Growth of an invasive legume is symbiont limited in newly occupied habitats**. Diversity and Distributions, v. 12, n. 5, p. 563–571, 2006.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. **Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system**. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 8, p. 3795–3801, 2002.

PAULA, R. C. de; VALERI, S. Vv.; MEDEIROS, R. L. S. e. **Produção de mudas Florestais por Propagação Vegetativa**. Jaboticabal, SP, 2016. .

PAULA, R. R. et al. **Evidence of short-term belowground transfer of nitrogen from *Acacia mangium* to *Eucalyptus grandis* trees in a tropical planted forest**. Soil Biology and Biochemistry, v. 91, p. 99–108, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071715002953>>.

PAZ, I. C. P. et al. ***Eucalyptus* growth promotion by endophytic *Bacillus* spp.** Genetics and molecular research : GMR, v. 11, n. 4, p. 3711–3720, 2012.

PEREIRA, A. de A. **The microbiome related to carbon and nitrogen cycling in pure and mixed *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* plantations**. 2018. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2018.

PEREIRA, A. P. A. et al. **Mixed *Eucalyptus* plantations induce changes in microbial communities and increase biological functions in the soil and litter layers**. Forest Ecology and Management, v. 433, n. October 2018, p. 332–342, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.11.018>>.

PEREIRA, A. P. D. A. et al. **Shifts in the bacterial community composition along deep soil profiles in monospecific and mixed stands of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium***. PLoS ONE, v. 12, n. 7, p. 1–16, 2017.

- PEREIRA, A. P. de A. et al. **Nitrogen-fixing trees in mixed forest systems regulate the ecology of fungal community and phosphorus cycling.** *Science of the Total Environment*, v. 758, p. 143711, 1 mar. 2021.
- PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. et al. ***Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects.** *Australian Journal of Botany*, v. 64, n. 8, p. 715–716, 2016.
- RACHID, C. T. C. C. et al. **Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 66, p. 146–153, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003807171300237X>>.
- RAHMAN, M. D. M. et al. **Consistent associations with beneficial bacteria in the seed endosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.).** *Systematic and Applied Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 386–398, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202018300845>>.
- REID, R. K.; REID, C. P. P.; POWELL, P. E.; SZANISZLO, P. J. **Comparison of siderophore concentrations in aqueous extracts of rhizosphere and adjacent bulk soils.** *Pedobiologia*, v.26, p.263-266, 1984.
- RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. **Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine**, 2012. .
- RODRAGUEZ-NAVARRO, D. N.; DARDANELLI, M. S.; RUÍZ-SAINZ, J. E. **Attachment of bacteria to the roots of higher plants.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 272, n. 2, p. 127–136, 1 jul. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x>>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- ROJAS-TAPIAS, D. et al. **Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*).** *Applied Soil Ecology*, v. 61, p. 264–272, 1 out. 2012.
- ROSA, D. D. et al. **Rooting of semihardwood cuttings of olive: Indolbutyric acid, calcium and *Azospirillum brasilense*.** *Comunicata Scientiae*, v. 9, n. 1, p. 34–40, 2018.
- RYAN, R. P. et al. **Bacterial endophytes: Recent developments and applications.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2007.
- SAITOU, N.; NEI, M. **The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees.** *Oxford journals*, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing chain-terminating inhibitors**. *Obstetrics and Gynecology*, v. 74, n. 4, p. 5463–5467, 1997.

SANTANA, M. C. **Análise da comunidade de fungos em áreas de monoculturas e consórcio de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***. 2017. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2017.

SANTOS, F. M. et al. **Dynamics of aboveground biomass accumulation in monospecific and mixed-species plantations of *Eucalyptus* and *Acacia* on a Brazilian sandy soil**. *Forest Ecology and Management*, v. 363, p. 86–97, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112715007550>>.

SANTOS, F. M. et al. **Nutrient cycling over five years of mixed-species plantations of *Eucalyptus* and *Acacia* on a sandy tropical soil**. *Forest Ecology and Management*, v. 384, p. 110–121, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112716308118>>.

SANTOS, karen C. F. dos. **ATIVIDADE BIOLÓGICA E BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS à *Atriplex nummularia* EM SOLO SALINO SÓDICO NO AGRESTE DE PERNAMBUCO**. 2010. Universidade federal de Pernambuco, 2010. Disponível em: <<https://www.golder.com/insights/block-caving-a-viable-alternative/>>.

SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; GOVINDAPPA, M. **Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review**. *Biocontrol Science and Technology*, v. 22, n. 8, p. 855–872, 2012.

SENEVIRATNE, G. et al. **Importance of Biofilm Formation in Plant Growth Promoting Rhizobacterial Action**. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 81–95.

SHARON, J. A. et al. **Isolation of efficient phosphate solubilizing bacteria capable of enhancing tomato plant growth**. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 16, n. 2, p. 525–536, 2016.

SILA, F. G. DA. **Promoção de crescimento vegetal por bactérias halotolerantes e reinoculação em *Atriplex nummularia* L.** 2014. 85 Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

- SILVA, C. R. A. et al. **Desenvolvimento biométrico de mudas de eucalipto sob diferentes lâminas de irrigação na fase de crescimento.** Pesquisa Florestal Brasileira, v. 35, n. 84, p. 381–390, 2015.
- SILVA, F. G. DA. **Promoção de crescimento vegetal por bactérias halotolerantes e reinoculação em** *Atriplex nummularia* L. 2014. 85 Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.
- SILVA, R. F. da. **Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal na produção de mudas de eucalipto.** 2018.
- SONG, Z. et al. **Evaluation of *Pantoea eucalypti* FBS135 for pine (*Pinus massoniana*) growth promotion and its genome analysis.** Journal of Applied Microbiology, v. 129, n. 4, p. 958–970, 10 out. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.14673>>. Acesso em: 21 jan. 2021.
- STACKEBRANDT, EBERS, J. (2006). **Taxonomic parameters revisited : tarnished gold standards.** Microbiol. Today 33, 152–155.
- STAPE, J. L. et al. **The Brazil Eucalyptus Potential Productivity Project: Influence of water, nutrients and stand uniformity on wood production.** Forest Ecology and Management, v. 259, n. 9, p. 1684–1694, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2010.01.012>>.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. ***Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects.** FEMS Microbiology Reviews, v. 24, n. 1, p. 487–506, 2000.
- SUKUMAR, P. et al. **Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions.** Plant, Cell and Environment, v. 36, n. 5, p. 909–919, 2013.
- TCHICHELLE, S. V. et al. **Biomass production, nitrogen accumulation and symbiotic nitrogen fixation in a mixed-species plantation of eucalypt and acacia on a nutrient-poor tropical soil.** Forest Ecology and Management, v. 403, n. July, p. 103–111, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2017.07.041>>.
- TEAM, R. Core et al. **R: A language and environment for statistical computing.** 2013.
- TEIXEIRA, D. A. et al. **Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, n. 1, p. 118–123, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000100025&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 24 jan. 2021.

- TONINI, H. et al. *Acacia mangium*: **ESPÉCIE POTENCIAL PARA REFLORESTAMENTOS ENERGÉTICOS NA REGIÃO NORTE**. [s.l: s.n.]. 2009 Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/68013/1/AP-2009-acacia-mangium.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2018.
- TRACHSEL, S. et al. **Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize**. Theoretical and Applied Genetics, v. 119, n. 8, p. 1413–1424, 2009.
- TURNBULL, A. L.; LIU, Y.; LAZAROVITS, G. **Isolation of Bacteria from the Rhizosphere and Rhizoplane of Potato (*Solanum tuberosum*) Grown in Two Distinct Soils Using Semi Selective Media and Characterization of Their Biological Properties**. American Journal of Potato Research, v. 89, n. 4, p. 294–305, 2012.
- VARGAS, F. S. et al. **Efeitos da mudança de recipiente em viveiro na qualidade de mudas de *Cassia leptophylla* Vogel, *Eugenia involucrata* DC. e de *Cedrella fissilis* Vell.** Revista Acadêmica: Ciência Agrária e Ambiental, v. 9, n. 2, p. 169–177, 2011.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. **Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice**. Journal of Biotechnology, v. 91, n. 2–3, p. 127–141, 2001.
- VIEIRA JUNIOR, J. et al. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. Embrapa Rondônia. Documentos, 155, 2013. . Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125981/1/doc-155-rizobacterias.pdf>>.
- VIEIRA, F. C. S., & Nahas, E. (2000). **Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo**. Scientia Agricola, 539-545.
- WALIA, A. et al. **Endophytic Bacteria: Role in Phosphate Solubilization**. In: MAHESHWARI, D. K.; ANNAPURNA, K. (Ed.). Endophytes: Crop Productivity and Protection: Volume 2. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 61–93.
- WOLLUM II, A. G. **Soil sampling for microbiological analysis**. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Ed.). Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 1-14.
- YANG, L. et al. **Carbon management practices regulate soil bacterial communities in response to nitrogen addition in a pine forest**. Plant and Soil, v. 452, n. 1–2, p. 137–151, 2020.

- YANG, Y. et al. **Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high-throughput pyrosequencing.** PLOS ONE, v. 12, n. 5, p. e0178425, 25 maio 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0178425>>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- YARTE, M. E. et al. **Isolation of endophytic bacteria from the medicinal, forestal and ornamental tree *Handroanthus impetiginosus*.** Environmental Technology (United Kingdom), v. 0, n. 0, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1818833>>.
- ZAIDI, A. et al. **Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, v. 56, n. 3, p. 263–284, 2009.
- ZHANG, P. et al. **The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis.** molecules, v. 24, p. 14, 2019.
- ZHAO, L. F. et al. **Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* train Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, p. 629–637, 2013.
- ZULUAGA, M. Y. A. et al. **Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the solis and rhizospheres of two species of *Solanum*,** 2020.

ANEXOS

Continua...

Anexo 1. Dendrograma construído com base em UPGMA e no algoritmo neighbor-joining. Sequencias foram alinhadas com os três melhores hits de cada alinhamento.

Anexo 2. Meio de cultura para bactérias diazotróficas assimbiontes (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999).

Ácido málico -----	5g/L
K ₂ HPO ₄ -----	0,6g/L
KH ₂ PO ₄ -----	1,8g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O -----	0,2g/L
NaCl -----	0,1g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O -----	0,02g/L
Fe EDTA (1,64%) -----	4mL/L
	Continua...

KOH -----	4,5g/L
Solução de micronutrientes -----	1mL/L
Vitamina sem biotina -----	1mL/L
Azul bromotimol -----	4mL/L
Ágar -----	2,35g/L
pH -----	7,5

Anexo 3. Meio de cultura para avaliar solubilização de Fosfato inorgânico de Cálcio bibásico (SFi)

Glucose -----	10g/L
NH ₄ Cl -----	5g/L
NaCl -----	1g/L
CaHPO ₄ -----	4g/L
Ágar -----	15g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O -----	1g/L
pH -----	7,2

Anexo 4. Meio de cultura modificado para avaliar produção de exopolissacarídeos (EPS) (SILVA, 2014)

Extrato de levedura -----	20,0g/L
K ₂ HPO ₄ -----	15,0g/L
MgSO ₄ -----	0,2g/L
MnSO ₄ -----	0,015g/L
FeSO ₄ -----	0,015g/L
CaCl ₂ -----	0,03g/L
NaCl -----	0,015g/L
Ágar -----	15,0g/L
Sacarose -----	100,0g/L
pH -----	7,3