



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. QUANTO À SUA
CAPACIDADE DE PROMOVER CRESCIMENTO EM MUDAS DE
TANGOR MURCOTT**

LUCAS CAMPOS FERREIRA

Araras

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. QUANTO À SUA
CAPACIDADE DE PROMOVER CRESCIMENTO EM MUDAS DE
TANGOR MURCOTT**

LUCAS CAMPOS FERREIRA

**ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. KATIA CRISTINA KUPPER
CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. FABRÍCIO ROSSI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural como requisito parcial à obtenção do título de **MESTRE EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

Araras
2021

Campos Ferreira, Lucas

Avaliação de isolados de *Bacillus* spp. quanto à sua capacidade de promover crescimento em mudas de tangor Murcott / Lucas Campos Ferreira -- 2021.

51f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Katia Cristina Kupper

Banca Examinadora: Victor Augusto Forti,

Marinês Bastianel

Bibliografia

1. Ácido indolacético. 2. Solubilização de fosfato.
3. Fixação de nitrogênio. I. Campos Ferreira, Lucas. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Lucas Campos Ferreira, realizada em 29/10/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Katia Cristina Kupper (UFSCar)

Prof. Dr. Victor Augusto Forti (UFSCar)

Profa. Dra. Marinês Bastianel (IAC)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural.

DEDICO

Aos meus pais, Reinaldo e Fernanda, por todo carinho e apoio, exemplos de trabalho e honestidade. Em memória de meu avô, José Fernando, meu grande professor. Minha eterna gratidão por todo amor e confiança sempre depositada.

OFEREÇO

Aos meus irmãos, Pedro, Rafael e Mateus, por serem sempre companheiros e também minha fonte de inspiração,

Aos meus avós, João Batista, Elizabeth e Maria Ângela, pelo apoio em todas as situações.

A minha namorada, Mariana Nunes Ferreira Cabral, por todo companheirismo.

*“...O homem deve ser livre...
O amor é que não se detém ante nenhum obstáculo,
e pode mesmo existir quando não se é livre.
E no entanto ele é em si mesmo
a expressão mais elevada do que houver de mais livre
em todas as gamas do humano sentimento.
É preciso não ter medo,
é preciso ter coragem de dizer.”*

Carlos Marighella

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Katia Cristina Kupper, pela orientação, amizade, paciência, oportunidade de aprendizado única e pelo acolhimento no Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC, meus sinceros agradecimentos;

Aos meus pais, Reinaldo Ferreira e Maria Fernanda Campos Ferreira, irmãos Pedro, Rafael e Mateus Campos Ferreira, por estarem sempre presente e serem minha fortaleza;

Ao meu querido avô José Fernando, que sempre me ensinou e incentivou em todas as etapas dessa jornada, e estará sempre presente nas próximas que virão, *in memoriam*;

Ao meu avô João Batista, grande companheiro, que a sua maneira, me ensinou e ensina sobre a vida, história e agricultura;

À minha avó Elizabeth, pelo carinho que nunca faltou ao longo dessa trajetória;

A minha avó Maria Ângela, por todo amor e incentivo;

À minha namorada, Mariana Nunes Ferreira Cabral, que nunca mediu esforços em ajudar ao longo do mestrado, além de todo amor e paciência em todos os momentos, muito obrigado!

Aos amigos que me acompanharam e estiveram presente no Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC: Vanessa Santos Moura, Fernanda Barbosa Francisco de Paula, Álisson Queiroz Moura e Natália de Castro, muito obrigado por toda ajuda, levo vocês no coração;

Ao Programa de Pós Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, pela oportunidade de realizar o mestrado e enriquecer o conhecimento na área que tanto acredito, me incentivando a sonhar cada vez mais;

À todos os professores do PPGADR, pelos ensinamentos e parceria;

À Cris, do PPGADR, por toda ajuda e amizade ao longo dessa jornada;

A Korin Agricultura e Meio Ambiente, pela oportunidade de realizar uma importante etapa desse projeto, em especial à Isabel e ao Valdionei;

Aos amigos de mestrado, em especial à Ricardo Carvalho e Patrícia Apolinário por toda amizade;

Aos amigos de república que me acolheram tão bem: Davi, Tiago, Edmílson, Luis e Maicon;

Aos funcionários do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC pela disponibilidade e amizade: Maria, Rose, Izabel, Vanderley, Franciel e Derik;

À todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a realização desse trabalho.

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

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 Agroecologia na agricultura e sociedade.....	6
2.2 Citricultura.....	9
2.2.1 Importância agrícola, econômica e social.....	8
2.2.2 Tangor Murcott.....	10
2.2.3 Produção de mudas cítricas e porta-enxertos.....	12
2.3 Microbiologia do solo.....	11
2.4 Bactérias promotoras de crescimento de plantas.....	16
2.4.1 <i>Bacillus spp.</i>	17
2.5 Mecanismos bacterianos ligados à promoção de crescimento vegetal.....	19
2.5.1 AIA.....	19
2.5.2 Solubilização de fosfato.....	21
2.5.3 Fixação de nitrogênio.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Micro-organismos.....	21
3.2.1 Produção de ácido indolacético (AIA).....	23
3.2.2 Solubilização de fosfato.....	24
3.2.3 Fixação de nitrogênio.....	25
3.3 Avaliação das bactérias para promoção de crescimento de mudas de tangor Murcott em diferentes porta-enxertos.....	26
4 RESULTADOS.....	28
4.1.1 Produção de ácido indolacético (AIA).....	28
4.1.2 Solubilização de fosfato.....	29
4.1.3 Fixação de nitrogênio.....	30
4.2 Avaliação de bactérias como agentes promotores de crescimento de mudas de tangor Murcott.....	31
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÕES.....	41
7 LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Altura da parte aérea da planta de citrumelo Swingle e limão cravo, após 60, 120, 240 e 300 dias, sob influência de isolados bacterianos	29
Tabela 2. Altura total, altura da muda a partir da enxertia, comprimento da raiz e número de folhas das plantas de tangor Murcott enxertadas sobre citrumelo Swingle e limão Cravo, sob influência de isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	32
Tabela 3. Massa verde da parte aérea e raiz e massa seca da parte aérea das plantas de tangor Murcott enxertadas sobre citrumelo Swingle e limão Cravo, sob influência de isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Avaliação dos isolados bacterianos quanto à produção de ácido indolacético (AIA).....	26
Figura 2. Índice de solubilização de fosfato (IS= Diâmetro do halo (mm) / Diâmetro da colônia (mm)).....	27
Figura 3. Solubilização de fosfato pelos isolados ACB-53 (A), ACB-57 (B) e ACB-26 (C).....	28
Figura 4. Fixação de nitrogênio por isolados de <i>Bacillus</i> spp., avaliada pela quantificação do nitrogênio total (mg/L-1).....	28
Figura 5. Avaliação de promoção de crescimento para porta-enxertos de citrumelo Swingle.....	30
Figura 6. Avaliação de promoção de crescimento para porta-enxertos de limão Cravo.....	30

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. QUANTO À
SUA CAPACIDADE DE PROMOVER CRESCIMENTO EM
MUDAS DE TANGOR MURCOTT**

Autor: LUCAS CAMPOS FERREIRA

Orientadora: Profa. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Co-Orientador: Prof. Dr. FABRÍCIO ROSSI

RESUMO

A citricultura é atualmente uma das principais atividades agrícolas no Brasil no segmento da fruticultura. No entanto, diversos fatores podem influenciar nos índices de produtividade da cultura, como a qualidade das mudas, sendo imprescindíveis a sua boa formação e a sanidade. Dessa forma, é de grande importância a escolha de um porta-enxerto de qualidade, uma vez que este exerce uma influência direta sobre as copas das plantas cítricas. A utilização de microrganismos com potencial para promoção de crescimento de plantas pode representar uma nova perspectiva no manejo de culturas agrícolas, tendo em vista a influência que exercem na nutrição e desenvolvimento da planta, gerando, inclusive, menores impactos ambientais nos ecossistemas, muitas vezes causados pelo uso abusivo de insumos agrícolas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar isolados de *Bacillus* spp. como agentes promotores de crescimento de mudas de tangor Murcott enxertadas em diferentes porta-enxertos de citros. Um total de 10 isolados foram avaliados *in vitro* quanto à: produção de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio. Os testes *in vivo* consistiram em ensaios de avaliação dos isolados bacterianos quanto ao crescimento em dois diferentes porta-enxertos: citrumelo Swingle (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) e limão Cravo (*Citrus limonia*), que após 300 dias foram enxertados com tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*). Avaliou-se a altura do porta-enxerto aos 60, 120, 240 e 300 dias após a semeadura e então, com 480 dias após a semeadura (180 dias após a enxertia), foram avaliados a altura total da planta, altura a partir da enxertia, comprimento da raiz, número de folhas, massa de matéria fresca de raiz e parte aérea e massa de matéria seca da parte aérea. Todos os isolados bacterianos foram capazes de produzir AIA, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio, sob

condições de laboratório; o isolado de *Bacillus* spp. ACB-07 apresentou um efeito positivo para o crescimento de mudas de tangor Murcott enxertadas em citrumelo Swingle, enquanto que o isolado ACB-08 apresentou potencial, como agente promotor de crescimento, em mudas de tangor Murcott enxertadas em Limão Cravo; verificou-se que, a habilidade de um isolado bacteriano em promover o crescimento de mudas de tangor Murcott depende, dentre outros fatores, da variedade do porta-enxerto utilizado.

Palavras-chave: Ácido indolacético, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, limão Cravo e citrumelo Swingle.

EVALUATION OF *Bacillus* spp. ISOLATES AND ITS ABILITY AS GROWTH-PROMOTING AGENTS IN MURCOTT TANGOR SEEDLINGS

Author: LUCAS CAMPOS FERREIRA

Adviser: Prof. Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Co- Adviser: Prof. Dr. FABRÍCIO ROSSI

ABSTRACT

Citriculture is currently one of the main agricultural activities in Brazil in the fruit growing segment. However, several factors can influence the crop's productivity indices, such as the quality of the seedlings, and its good formation, vigor and health are essential. Therefore, the choice of a quality rootstock is of great importance, since it has a direct influence on the citrus plant aerial parts. The use of microorganisms with potential to promote plant growth may represent a new perspective in crop management, considering the influence they exert on plant nutrition and health, even generating lower environmental impacts on ecosystems. Therefore, the aim of the present study was to evaluate bacteria as growth-promoting agents for Murcott tangor seedlings grafted onto different citrus rootstocks. A total of 10 *Bacillus* spp. isolated were evaluated *in vitro* for: indoleacetic acid (IAA) production, phosphate solubilization and nitrogen fixation. The *in vivo* tests consisted of assays to evaluate bacterial isolates for growth promotion on two different rootstocks: Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* × *Poncirus trifoliata*) and Rangpur lime (*Citrus limonia*), which after 300 days were grafted with Murcott tangor (*C. sinensis* × *C. reticulata*). The parameters of interest analyzed were the height of the rootstock at 60, 120, 240 and 300 days after sowing and then, at 480 days after sowing (180 days after grafting), the following were evaluated: the total height of the plant, graft height, root length, number of leaves, root and aerial parts green mass and aerial parts dry mass. The results showed that all bacterial isolates were able to produce AIA, to solubilize phosphate, and to fix nitrogen; under laboratory condition; the *Bacillus* spp. ACB-07 had a positive effect on the growth of Murcott tangor seedlings grafted on Swingle citrumelo, while the isolate ACB-08 showed potential as a

growth promoter in Murcott tangor seedlings grafted on Rangpur lime, it was found that the ability of a bacterial isolate to promote the growth of Murcott tangor seedlings depends, among other factors, on the variety of rootstock used.

Keywords: Indoleacetic Acid, Phosphate Solubilization, Nitrogen Fixation, Rangpur Lime and Swingle citrumelo.

1 INTRODUÇÃO

A Citricultura é um dos mais importantes setores agrícolas, sendo a cultura cultivada em 135 países, com destaque para o Brasil, considerado o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja (USDA, 2020). Considerando a cadeia produtiva de mudas cítricas, afim de atender a demanda de pomares comerciais, o porta-enxerto é um componente importante, pois desempenha forte influência no crescimento da copa, na nutrição e na tolerância da planta aos estresses bióticos e abióticos (CASTLE, 2010;STOVER et al., 2016;ZHOU et al., 2014). Dentre os porta-enxertos, o citrumelo Swingle e limão-Cravo são os mais comumente utilizados na produção de mudas (CASTLE, 2010). Dentre as variedades de copa, amplamente utilizadas para produção de frutas de mesa, destaca-se o tangor Murcott (ABOBATTA, 2019).

Dada a importância do período de formação das mudas nos viveiros, a aplicação de microrganismos benéficos com potencial para promoção de crescimento (GIASSI; KIRITANI; KUPPER, 2016); o controle biológico (MOHAMMED; HUSSEIN; TOAMA, 2019) e a indução de resistência (DE SOUZA et al., 2019), apresentam-se como uma forma de auxiliar no desenvolvimento da planta, promovendo, além da diminuição da utilização de adubos minerais, o encurtamento da fase de crescimento das mudas. Tais estratégias visam contribuir para uma citricultura mais sustentável, considerando que o abuso e uso indevido de fertilizantes minerais muitas vezes são responsáveis por causarem problemas de saúde pública e de poluição ambiental (ZAHOOR et al., 2014).

A rizosfera consiste na região do solo em que se encontra a maior influência das raízes das plantas, além de também exercerem influência nas características biológicas e químicas do solo. Segundo Raza et al. (2016), as plantas possuem uma relação simbiótica com diversos microrganismos do solo que habitam a rizosfera, dentre esses estão as rizobactérias promotoras de crescimento (RPC), que possuem efeitos benéficos para a planta hospedeira.

Os mecanismos utilizados pelas RPC's promoverem o crescimento de culturas agrícolas correspondem à fixação biológica de nitrogênio (FBN), à

síntese de hormônios de crescimento de plantas (AIA, ácido giberélico, citocininas e etileno), à produção de sideróforos e solubilização de minerais como fósforo, potássio e zinco (HU et al., 2017). Dentre os gêneros de bactérias mais estudados, destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium* (AHMAD; IQBAL; KHAN, 2008).

Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo, avaliar a capacidade de dez isolados de *Bacillus* spp. em produzir AIA, fixar nitrogênio e solubilizar fosfato, sob condições de laboratório e, verificar o seu potencial como agentes promotores de crescimento de mudas de tangor Murcott enxertadas em citrumelo Swingle e limão Cravo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agroecologia na agricultura e sociedade

Há um consenso nos últimos anos que o sistema alimentar e agrícola industrial vigente, não estão atendendo a demanda de questões importantes, que incluem a diminuição das taxas de fome e desnutrição, meios de subsistência para o desenvolvimento rural e a diminuição do impacto ambiental. Além disso, a partir das preocupações com a saúde, decorrentes das crises sanitárias, como é o caso da COVID-19, são esperados impactos de curto, médio e longo prazo nos sistemas alimentares, assim como, na segurança alimentar e nutricional (HLPE, 2020; WEZEL et al., 2020). Somado a isso, as mudanças climáticas, associadas ao aquecimento global, tornam a agricultura industrial convencional cada vez mais arriscada. Mais de um bilhão de hectares do planeta estão dedicados ao monocultivo de cereais e animais, reduzindo perigosamente a diversidade genética presente nos sistemas agrícolas globais. Esses sistemas de monocultura intensiva de homogeneidade ecológica são particularmente vulneráveis às mudanças climáticas, assim como às pragas e doenças (NICHOLLS; ALTIERI, 2019).

A partir dessas demandas, a agroecologia tem se mostrado cada vez mais essencial para um desenvolvimento sustentável das atividades agrícolas. A agroecologia é um conceito dinâmico que ganhou destaque no discurso científico, agrícola e político nos últimos anos. Embora muito mais visível nos

últimos 20 anos, o primeiro uso do termo é datado do início do século XX, conseqüentemente, seu significado, definições, interpretações e abordagens também evoluíram (ERNESTO MÉNDEZ; BACON; COHEN, 2013; NICHOLLS; ALTIERI, 2019). Hoje, a agroecologia está associada a um conjunto de princípios para a gestão agrícola e ecológica dos sistemas agroalimentares, bem como a alguns princípios socioeconômicos, culturais e políticos mais abrangentes. Estes últimos princípios surgiram apenas recentemente na literatura, decorrentes da atividade de movimentos sociais que usam a agroecologia como base fundamental de seu trabalho (WEZEL et al., 2020).

Baseado nesse conceito, de acordo com Sevilla Guzmán (2017), a Agroecologia visa um manejo ecológico dos recursos naturais, através de um enfoque holístico e mediante a aplicação de uma estratégia sistêmica, reconduzir o curso alterado da coevolução social e ecológica, através do controle das forças produtivas que bloqueie seletivamente as formas degradantes e exploradoras, da produção e do consumo, causadores da atual crise ecológica. Sendo de grande importância a utilização de estratégias baseada na dimensão local, através do conhecimento camponês, potencializando a biodiversidade ecológica e sociocultural mediante o desenho de sistemas alternativos de agricultura.

Dessa forma, os processos de transições agroecológicas nos permitem levar a diversos tipos de agriculturas e arranjos determinados por elementos da cultura local dos diferentes grupos sociais envolvidos e das variedades de agroecossistemas, nos quais se esteja trabalhando. Sendo assim, as condições ecológicas influenciarão nas decisões dos agricultores, da mesma maneira que os elementos da cultura local estarão presentes nos diferentes manejos dos recursos naturais e de organização social, mostrando assim uma interação entre os diferentes meios. Estas ações, por sua vez, contribuirão (ou não) para o enfrentamento dos sistemas convencionais de plantio, circulação e consumo (CAPORAL, 2020).

2.2 Citricultura

2.2.1 Importância agrícola, econômica e social

Os frutos derivados do gênero *Citrus* e gêneros relacionados (*Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, e *Microcitrus*), principalmente, as laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e tangerinas (*C. Reticulata* Blanco), são amplamente consumidos em todo o mundo como sucos ou, frutas *in natura*, fornecendo importantes fontes de vitamina C e outros compostos ligados à saúde humana (WU et al., 2014). Os centros de origem de grande parte das espécies desse gênero provem da região sul e sudeste asiática, as quais experimentaram uma complexa história de misturas e variações genéticas, conceitualmente semelhante a outras árvores frutíferas, como maçã e uva (CORNILLE et al., 2011; CORNILLE et al. 2012; WU et al., 2018).

Devido a excelentes condições edafoclimáticas, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil a partir do início do processo de colonização e espalharam-se então por todo o território nacional. Atualmente, a citricultura está presente em mais de três mil municípios brasileiros. A combinação de uma indústria cítrica competitiva estabelecida e uma produção agrícola desenvolvida fez com que fosse possível para o Brasil se tornar o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja (KALAKI; NEVES, 2017; USDA, 2020).

O estado de São Paulo apresenta-se como o maior produtor de laranja do país, alcançando na safra de 2019 a produção de 13.650.000 de toneladas, o que corresponde a 79% da produção nacional (CONAB, 2020). Além da alta produtividade, a citricultura registrou crescimento na geração de empregos nos primeiros sete meses da safra 2020/2021. Entre o período de Julho de 2020 a janeiro de 2021, a atividade gerou um total de 19.560 admissões, sendo 17.050 no Estado de São Paulo, o que representa 11,29% do total de 151.067 vagas criadas pela Agricultura no Estado (CAGED, 2021).

2.2.2 Tangor Murcott

Assim como as demais espécies de citros, as diversas variedades de tangerinas são originárias do sul e sudeste asiático, que então, difundiram-se amplamente pela China, onde provavelmente foram domesticadas. Toda a extensa rede de parentesco entre tangerinas e laranja doce, com características desejáveis de frutos, sugere um complexo processo de

domesticação que ainda permanece mal compreendido. As tangerinas fazem parte de uma classe de frutas cítricas que possuem tamanho pequeno, são facilmente descascadas e de alto valor comercial (WU et al., 2018).

A produção global de tangerina para 2020/21 é estimada em um recorde de 33,3 milhões de toneladas, com crescimento esperado em quase todos os mercados. A produção e o consumo apresentaram tendência de alta nos últimos 20 anos, com base no crescimento da China, UE, Turquia e Estados Unidos (USDA, 2020). O Brasil é o sexto maior produtor de tangerina, alcançando a marca de 1.026.638 toneladas no ano de 2020, com tendência de crescimento nos últimos cinco anos, sendo a venda focada para o mercado interno (IBGE 2021). O estado de São Paulo apresenta-se como maior produtor também nesse segmento, sendo responsável por 33% da produtividade nacional. As principais variedades cultivadas são a Ponkan e o Tangor Murcott, os quais representam 80% da área plantada, essa última cultivada em mais de cinco mil hectares no estado (IBGE 2021).

Dentre as diversas variedades de plantas cítricas cultivadas no Brasil, o tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*) merece destaque. O tangor Murcott é um híbrido de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) com laranja doce (*Citrus sinensis* [L.] Osb.) pertencente à Família Rutaceae e de parentais desconhecidos. Originou-se em 1922, a partir de uma enxertia realizada pelo viveirista Charles Murcott Smith, da onde provém sua denominação (ABOBATTA, 2019). Sua introdução no Brasil ocorreu em 1948, através do Instituto Agrônomo (IAC), visando avaliar a sua capacidade como porta-enxerto na presença do vírus da Tristeza do Citros. A partir da década de 60, motivado pela maturação tardia e a possibilidade de utilização pela indústria, foi despertado o interesse na sua produção em larga escala (POMPEU JÚNIOR, 2001).

As plantas de Murcott são moderadamente vigorosas, apresentam copa com porte médio e os ramos com tendência de crescimento vertical. Possui folhas lanceoladas, com tamanho de pequeno a médio. Flores completas, com sacos embrionários e grãos de pólen férteis. Os frutos são produzidos em cachos na extremidade terminal e apresentam formato achatado nos polos, tamanho de médio a grande (1130 a 200g), casca de espessura fina, lisa e brilhante. Os frutos apresentam excelente qualidade para consumo in natura e

possuem alta demanda, mesmo sendo mais difíceis de descascar do que as tangerinas comuns. Possui a maturação dos frutos tardia, onde a colheita é realizada de agosto a outubro, dependendo das condições de cultivo e de clima (ABOBATTA, 2019). O destino do tangor 'Murcott', assim como grande parte das outras tangerinas, é em sua maioria o mercado de frutas *in natura*, ficando o processamento apenas para indústrias locais. Dessa forma, atributos de qualidade, de acordo com a preferência do consumidor, são de extrema importância para uma boa comercialização (PACHECO et al., 2016).

2.2.3 Produção de mudas cítricas e porta-enxertos

Na busca pelo sucesso econômico de uma cultura, produzir mudas bem formadas e sadias é um papel fundamental. A sanidade das mudas deve ser assegurada durante todo o processo, mantendo-as livres da presença de patógenos, seja em área livre da doença ou, pelo material propagativo contaminado, evitando-se assim a morte precoce das plantas. Caso contrário, poderá ocorrer o aparecimento de epidemias, com consequente elevação do custo da produção. A origem de patógenos podem ser diversas: sementes, estacas, vento, água, ferramentas, plantas hospedeiras, substratos e solos, plantas hospedeiras, operação (VENTURA et al., 2017). A partir deste contexto, surgiram normas para garantir a qualidade e seguridade das mudas e, conseqüentemente dos pomares, como a Portaria CDA – 17, de 05 de abril de 2018, que apresenta todas as determinações necessárias para produção de mudas cítricas sob ambiente protegido (DEFESA AGROPECUÁRIA ESTADO DE SÃO PAULO, 2021).

Os avanços tecnológicos incorporados à produção de plantas cítricas em viveiros protegidos contribuíram para conter a disseminação do vírus da Tristeza do Citros, Clorose Variegada do Citros (CVC) e, mais recentemente o Huanglongbing (HLB) ou Greening, e permitiram um sistema de produção de árvores de alta qualidade, principalmente, no estado de São Paulo. A possibilidade de controlar os fatores ambientais em ambientes controlados e o manejo adequado de fertilizantes, fitossanidade e irrigação resultaram na produção de porta-enxertos e árvores enxertadas de excelente qualidade em

menor tempo, em comparação ao campo tradicional e desprotegido (CARVALHO et al., 2019).

Após décadas de pesquisa, é possível afirmar que a utilização de porta-enxertos foi crucial para o sucesso da citricultura, tanto para o manejo de doenças quanto para produtividade. Por se tratar de uma espécie perene, é de fundamental importância a escolha do porta-enxerto que apresente genes de resistência ou tolerância às doenças do local do plantio, assim como as condições climáticas (VENTURA et al., 2017).

Um porta-enxerto de qualidade, também fornece principalmente uma redução no período juvenil da planta, agilizando seu tempo de produção e no vigor da árvore quando comparado com plantas não enxertadas; assim, as árvores cítricas propagadas com porta-enxerto combinado com copa livre de patógenos trazem um grau muito melhor de uniformidade e consistência para um pomar (CASTLE, 2010). A absorção de nutrientes e água pela planta, dependendo da variedade do porta-enxerto, poderá favorecer e influenciar no conteúdo mineral da folha e na eficiência de produção dos frutos cítricos (ROZANE et al., 2009).

Com o surto do vírus da tristeza do citros no final da década de 1930, predominou-se a utilização do limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) como porta-enxerto, o qual tem sido utilizado principalmente para produzir clones nucelares de laranja doce sem a presença do vírus. Além dessa importante questão, outras razões para seu sucesso como porta-enxerto incluem: sua rusticidade, resistência à seca e o vigor no viveiro e no campo, bem como a precocidade da sua frutificação e elevada produtividade (POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2014).

Devido a sua produtividade e maior resistência à seca, o limão Cravo continua como o mais utilizado porta-enxerto no Brasil. No entanto, devido ao aparecimento da Morte Súbita do Citros em certas plantas enxertadas em limão Cravo, foi incentivado a utilização do porta enxerto Citrumelo Swingle. A partir de programas de melhoramento genético realizados pela Universidade da Califórnia, surgiu o híbrido Citrumeleiro Swingle [*C.paradisi* Macfad. cv Duncan x *P. trifoliata*] o qual foi testado nos anos 1940 e desde então utilizado como porta-enxerto em variedades comerciais em vários países (BASTOS; FERREIRA; PASSOS, 2014). Foi introduzido no Brasil devido à sua resistência à tristeza, à gomose, à morte súbita, ao nematoide e ao frio, além de propiciar

para suas copas a produção de frutos de boa qualidade, com altos teores de açúcares e rendimento de suco (BASTOS; FERREIRA; PASSOS, 2014; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2014). Em 2015, a porcentagem de variedades de porta-enxertos utilizados nos pomares paulistas era de 46,2% limoeiro 'Cravo', 19,4% citrumelo 'Swingle', 4,6% tangerina 'Sunki' e 2,5% tangerina 'Cleopatra'. No entanto, essa distribuição tende a mudar ao longo do tempo, com o uso de citrumelo 'Swingle' provavelmente superando o de limão 'Cravo' em um futuro próximo. Em 2016, 50% dos cerca de 10,5 milhões de mudas produzidas nos viveiros paulistas foram enxertadas em citrumelo 'Swingle', com apenas 33% enxertado em limão 'Cravo' (CARVALHO et al., 2019).

2.3 Microbiologia do solo

O solo pode ser considerado um complexo sistema vivo, em que as atividades que ali ocorrem, como a regulação da qualidade da água e do ar, o ciclo e transformação dos elementos, são capazes de trazer benefícios a saúde e sobrevivência humana (SIQUEIRA et al., 1994). Nas áreas onde o solo encontra-se apto para cultivo, diferentes espécies de plantas podem ser cultivadas, tornando-o um dos maiores reservatórios de biodiversidade do planeta. Sendo assim, o solo é também um recurso básico para a produção de alimentos para humanos e animais, além de diferentes materiais como fibras têxteis, biocombustíveis, madeira e fibras para construção (RILLIG et al., 2018; WALL et al., 2019).

Considerados atualmente como uma das mais importantes e essenciais partes do sistema do solo, os organismos que o habitam possuem dentre as mais diferentes funções atribuídas a estes, algumas amplamente conhecidas, a capacidade de degradação de compostos orgânicos, e conseguinte, ciclagem de nutrientes (MIRANSARI, 2013).

Cerca de 10^{4-8} espécies microbianas estão presentes em 1 grama de solo, incluindo algas, bactérias, fungos, protozoários e vírus, com destaque a biomassa bacteriana, que tende a ser a maior na maioria dos casos (SINGH et al., 2020). Todos os microrganismos presentes no solo estão envolvidos em várias atividades, incluindo fertilidade, ciclagem de nutrientes e decomposição

de substâncias inorgânicas e orgânicas. Dessa forma, além das propriedades químicas e biológicas, as propriedades físicas do solo, incluindo estrutura, aeração, porosidade e permeação de água, são diretamente influenciadas pela microbiota do solo (SINGH et al., 2020).

As bactérias e fungos representam juntos, cerca de 1 a 4% da matéria orgânica do solo. No entanto, dadas às alterações que ocorrem em solos cultivados, tende-se a encontrar maior massa de bactérias em solos cultivados, enquanto a biomassa fúngica domina em solos não cultivados (DE VRIES et al., 2006; SINGH et al., 2020; STRICKLAND; ROUSK, 2010).

A microbiota do solo é responsável direta ou indiretamente por processos microbiológicos e bioquímicos diversos que exercem influência na manutenção da sustentabilidade dos ecossistemas terrestres (SIQUEIRA et al., 1994). Ainda segundo Siqueira e Frando (1988), as principais relações biológicas que ocorrem possuem decorrências ecológicas e funcionais. A interação entre microrganismos (competição, antibiose e predação) pode influenciar na decomposição e mineralização da matéria orgânica. O equilíbrio entre esses tipos de interação pode determinar o equilíbrio biológico do solo e também controlar ou evitar surtos de doenças. Ainda, a interação dos microrganismos com a fauna do solo também interfere na decomposição e na ciclagem de nutrientes, favorecendo a ciclagem da matéria orgânica.

Na rizosfera, os microrganismos e as raízes têm uma relação direta, em que a presença ou, ausência de microrganismos podem influenciar na disponibilidade e absorção de nutrientes. Ainda, a presença de microrganismos na rizosfera tende a estimular a produção de substâncias reguladoras do crescimento vegetal (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). Relações simbióticas mutualistas com as raízes (micorrizas e nodulações) também podem favorecer a nutrição e produção das plantas, diminuindo a necessidade de insumos, atuando na ciclagem de nutrientes e reduzindo danos causados por estresses bióticos (pragas e doenças) e abióticos (MIRANSARI, 2013; RILLIG et al., 2018). No entanto, a presença de microrganismos no solo também pode levar a uma relação patogênica e parasítica com as raízes, inviabilizando o cultivo nas áreas afetadas. Sendo assim, práticas que favorecem a diversidade e a atividade de microrganismos deve ser estimuladas, gerando estabilidade e diversidade nos ecossistemas (WALL et al., 2019).

É sabido que a diversidade da vegetação natural contribui significativamente para aumentar a biodiversidade do solo, enquanto que os intensos monocultivos restringem as populações microbianas do solo, causando a redução da biodiversidade (FERREIRA; STONE; MARTIN-DIDONET, 2017). Nas últimas décadas, o uso extensivo de agroquímicos levou à deterioração do solo, uma das consequências mais graves da agricultura tradicional (SINGH et al., 2020).

Antes da Revolução Industrial, as práticas agrícolas dependiam principalmente de recursos internos, isto é, havia reciclagem de matéria orgânica e rotação de culturas com objetivo de fazer a manutenção dos nutrientes do solo, sem que houvesse prejuízos evidentes ao meio ambiente (SINGH et al., 2020). No entanto, com a modernização da agricultura, o equilíbrio natural entre meio ambiente e agricultura foi prejudicado.

O uso excessivo e a longo prazo de fertilizantes químicos (N, P e K) prejudicou e segue prejudicando a microflora nativa do solo, sua textura e produtividade, bem como atividades enzimáticas do solo, impactando também na qualidade da saúde humana (PANTANO et al., 2016; SINGH et al., 2020).

2.4 Bactérias promotoras de crescimento de plantas

Atualmente, cada vez mais, há um crescimento da demanda por estudos que buscam investigar a diversidade de microrganismos no solo, tendo em vista sua importância e desempenho na manutenção dos ecossistemas (LOPES et al., 2021). O conhecimento e a manipulação do microbioma das plantas surgiram como um recurso biotecnológico que se alinha ao aumento da sustentabilidade na agricultura, pois estes são capazes de promover crescimento vegetal e, além disso, servem como controle biológico de pragas e doenças e atuam protegendo a planta de estresse biótico e abiótico (DE SOUZA et al., 2019). Esses recursos biotecnológicos surgem também como alternativas para substituição, pelo menos parcial, de fertilizantes minerais industrialmente processados (GLICK, 2012).

A rizosfera é considerada uma região de intensa atividade microbiana provocada pelos exsudatos radiculares (OLIVEIRA; URQUIAGA; BALDANI, 2003). Sendo assim, este é o local considerado como o de intersecção entre solo-planta, onde ocorrem as interações entre microrganismos, solos e planta. Diversos fatores podem levar o microrganismo a se associar com as plantas, dentre eles estão a interação entre os genótipos do vegetal e do microrganismo (OLIVEIRA; URQUIAGA; BALDANI, 2003).

A interação dos microrganismos pode-se dar por diferentes formas, de forma que funcione coletivamente como um microbioma. Possuem a capacidade de colonizar os três compartimentos da raiz separadamente: rizosfera, rizoplano e endosfera, além de todos os tecidos internos das plantas, como a superfície das folhas (filosfera), as chamadas bactérias endofíticas (HARDOIM et al., 2015). O efeito da interação planta-microrganismo pode ser benéfico para a planta hospedeira, auxiliando no seu desenvolvimento, ou tornar-se prejudicial quando o microrganismo parasita a planta levando à diminuição do seu crescimento ou à morte. Em ambos os casos, é extremamente importante compreender essa interação para estimular aqueles que auxiliam no desenvolvimento vegetal, bem como estabelecer formas de controle dos fitopatógenos (HARDOIM et al., 2015; MEENA et al., 2016).

A indução de resistência pode ocorrer após exposição da planta a um agente indutor, que ativa mecanismos de defesa de forma generalizada (DE SOUZA et al., 2019). O agente indutor pode ser um ativador químico, extratos de células de microrganismos ou microrganismos vivos. Nesse último caso, quase sempre os agentes são classificados como (rizo)bactérias promotoras do crescimento (BABALOLA; GLICK, 2012; GLICK, 2012). Existem casos comprovados de que a inoculação de bactérias promotoras de crescimento à rizosfera torna a parte aérea mais resistente a patógenos. Além disso, a comunidade microbiana pode auxiliar na tolerância à alta salinidade e à seca que interferem no desenvolvimento e produtividade das plantas (GLICK, 2012; HARDOIM et al., 2015).

2.4.1 *Bacillus spp.*

O gênero *Bacillus* foi estabelecido em 1872 por Cohn e abrange mais de 200 espécies descritas e subespécies pertencentes ao filo Firmicutes. São bactérias em formatos de bastonete, gram-positivas, aeróbias ou, facultativamente anaeróbicas. Devido à sua ampla habilidade fisiológica e capacidade de formar endosporos, espécies de *Bacillus* são resistentes a condições ambientais adversas e onipresentes em uma ampla gama de habitats, incluindo solo. Estas bactérias são predominantes no solo e na rizosfera, onde compreendem até 95% das populações de bactérias Gram-positivas (MILJAKOVIĆ; MARINKOVIĆ; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, 2020).

Dentre as bactérias promotoras de crescimento, linhagens de *Bacillus spp.* se destacam por já terem sido reportadas como promotoras de crescimento de variadas culturas. Foi relatado que *B. pumilus* quando inoculado na semente de alface (*Lactuca sativa*) causou um incremento da biomassa aérea e no teor de fósforo (DE ARAUJO, 2008). *B. subtilis* e *B. megaterium*, quando inoculados em solo para cultivo de aveia (*Avena sativa* L.) promoveram incremento no crescimento e na sua qualidade nutricional (LOPES et al., 2021). *B. subtilis* quando inoculado nas folhas de milho (*Zea mays* L.) causou incremento da altura e da produtividade (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Além disso, linhagens de *Bacillus* já foram reportadas para utilização em biofertilizantes, biopesticidas, biofungicidas e destaca-se por ser uma bactéria produtora de endósporos, fator que facilita o seu manuseio e aplicação, além de possibilitar a mistura com outras linhagens bacterianas (BETTIOL et al., 2012; MEENA et al., 2016).

Como bioestimulantes, os microrganismos podem modular a síntese de fitohormônios, alterando o metabolismo vegetal, de modo que a planta se adapte às condições ambientais (MEENA et al., 2016). As bactérias do gênero *Bacillus*, por agirem como aceleradores de crescimento mitigam o estresse causado pelo meio ambiente através da produção de auxina (AIA), citocinina, giberilina, ácido abscísico (ABA), ACC deaminase, brassinoesteróides e estrigolactonas (BETTIOL et al., 2012). Outro fator importante é o efeito que uma maior produção de ACC-deaminase pode causar. Quando este composto ocorre em maiores concentrações, há redução de etileno, conseqüentemente,

diminuindo os efeitos do etileno no vegetal, como senescência e clorose foliar (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

Produtos biológicos à base de microrganismos são frequentemente estudados como produtos multifuncionais (FERNANDEZ et al., 2019), pois além de serem empregados para promoção de crescimento, também podem promover o controle de fitopatógenos. Estudos com *B. subtilis* isolados de *Citrus sinensis* foram realizados por Singh e Deverall (1984) e por Kupper e Gimenes-Fernandes (2002) para utilização deste microrganismo no combate a fungos da mesma cultura. Visto que outras espécies de *Bacillus* também foram empregadas em outros estudos para controle de doenças em citros, este gênero de bactérias é promissor para desenvolvimento e comercialização de produtos de biocontrole (CHEN et al., 2020).

2.5 Mecanismos bacterianos ligados à promoção de crescimento vegetal

Os microrganismos promotores de crescimento, incluindo bactérias do gênero *Bacillus*, atuam por mecanismos diretos ou, indiretos de promoção do crescimento vegetal. Os mecanismos de ação direta desses microrganismos incluem a fixação biológica de nitrogênio, síntese de sideróforos, produção de fitormônios, solubilização de fósforo e aceleração dos processos de mineralização (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

Para os mecanismos de ação indireta incluem a indução de resistência sistêmica nos vegetais, produção de sideróforos, diminuição de fatores de estresse como o etileno endógeno, produção de antibióticos e antagonismo a fitopatógenos, entre outros fatores. Alguns microrganismos possuem a capacidade de realizar diversos destes mecanismos, sendo que sua ação em particular poderá ocorrer por diferentes modos de ação durante o ciclo da planta, e seu impacto no crescimento da planta, irá depender das propriedades físico-químico-biológicas do solo onde esta se desenvolve, o que reforça que estudos amplos devem ser realizados (GOMES et al., 2016; OLIVEIRA; URQUIAGA; BALDANI, 2003).

2.5.1 AIA

A auxina é um grupo heterogêneo de molécula sinalizadora de ácido carboxílico responsável por regular os vários processos fisiológicos das plantas. Ela é sintetizada nas partes aéreas (ápice do caule) e transportada para as partes subaéreas e raízes (PARK et al., 2017). O ácido indolacético (AIA), pertencente à classe das auxinas, é uma potente molécula de sinalização, essencial para interações planta-microrganismo e atua diretamente no crescimento da planta (MATSUDA et al., 2018). A maioria das rizobactérias é capaz de produzir e sintetizar AIA. O AIA produzido pelas bactérias altera o nível de auxina da planta para níveis ideais ou supra-ideais e melhora o crescimento da planta diretamente, sendo crucial para seu desenvolvimento (IQBAL; WAGI; AHMED, 2018).

A produção de ácido fitohormônio indol-3-acético (AIA) por bactérias endofíticas é uma das principais contribuições para as plantas (WAGI; AHMED, 2019). Estima-se que cerca de 80% das bactérias rizosféricas possuam capacidade de síntese de AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Esta capacidade é observada tanto em bactérias patogênicas como *Pantoea agglomerans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* e *Pseudomonas syringae*, quanto em RPCP's como *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* (WAGI; AHMED, 2019).

A promoção de crescimento da planta por meio deste hormônio deve-se, principalmente, pelo seu estímulo para a divisão celular bem como diferenciação de células e tecidos a formação, gerando aumento de raízes laterais, contribuindo então para um ganho na absorção de água, nutrientes e na geração de exsudatos radiculares (DUCA et al., 2014). Esse estímulo ao sistema radicular contribui para uma maior colonização bacteriana, amplificando o efeito de inoculação.

Um único organismo bacteriano pode produzir AIA por diferentes rotas biossintéticas, como a via do indol-3-acetamida (IAM), a via do indol-3-piruvato (IpyA), a via do indol-3-acetonitrila (IAN), a via da cadeia lateral do triptofano-oxidase e as vias da triptamina que foram relatadas por Spaepen et al. (2007), sendo o triptofano, exsudato natural das raízes das plantas, identificado como o principal precursor das vias de biossíntese de AIA em bactérias, contribuindo na interação planta-microrganismo (BLAKE; CHRISTENSEN; KOVACS, 2021).

2.5.2 Solubilização de fosfato

O fósforo é um dos mais importantes nutrientes exigidos pelas plantas e quando utilizado em quantidades adequadas auxilia à um crescimento e desenvolvimento considerado ótimo. Ele está presente em quase todos os principais processos metabólicos, incluindo transferência de energia, transmissão de sinal, respiração, biossíntese macromolecular e fotossíntese (ANAND; KUMARI; MALLICK, 2016). Apesar de estar presente em grande parte dos solos cultiváveis, em ambiente tropical e subtropical, a maior parte encontra-se em uma forma insolúvel, não assimilável pela planta (MILLER et al., 2010) e, conseqüentemente elevando a necessidade de aplicação de fósforo nas lavouras. Porém, a maior proporção do fósforo presente em fertilizantes minerais torna-se inacessível no solo, devido à formação de fortes ligações entre as moléculas de fósforo com cálcio e magnésio, em solos alcalinos e, com ferro e alumínio, em solos ácidos (SHARMA; KUMAR; TRIPATHI, 2011). Aplicações em excesso de fertilizantes fosfatados também ocasionam problemas ambientais, principalmente, por lixiviação e erosão (ZENG; WU; WEN, 2016). Nos últimos anos, os microrganismos solubilizadores de fosfato têm se apresentado como uma abordagem alternativa aos fertilizantes fosfatados minerais, principalmente, algumas bactérias como os *Bacillus* (ALMONEAFY et al., 2014).

Diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de selecionar bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico (BATISTA et al., 2017; WANG et al., 2020). Relatos na literatura mostram que as bactérias promotoras de crescimento têm capacidade de produzir enzimas (fosfatases ácidas) e ácidos orgânicos que são capazes de disponibilizar o fosforo pouco solúvel que estão ligados a compostos como Fe e Al ou a matéria orgânica (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017), visando a promoção de crescimento de plantas e a dinâmica desse nutriente no solo (BATISTA et al., 2017; MILLER et al., 2010).

2.5.3 Fixação de nitrogênio

Entre os quatro elementos essenciais mais abundantes nos organismos vivos, o nitrogênio possui um papel de destaque. Toda forma de vida no planeta necessita de nitrogênio, sendo esse um elemento essencial na a formação de biomoléculas, com destaque para proteínas e seus derivados (enzimas, peptídeos e aminoácidos) e ácidos nucléicos (DNA e RNA) (FALKOWSKI, 1997; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). O desenvolvimento da biomassa vegetal e a produtividade de muitos ecossistemas são limitados pela disponibilidade de nitrogênio, pois esse elemento é um fator vital no crescimento de plantas (ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2017; ELSER et al., 2007).

Embora o nitrogênio molecular (N_2) seja um recurso ilimitado, constituindo cerca de 80% da atmosfera, esta não é uma forma útil para as plantas (ANDREOTE; PEREIRA E SILVA, 2017), enquanto que nos solos está presente na forma orgânica, sendo encontrado na matéria orgânica, e inorgânica, assumindo diferentes formas. No entanto, apenas alguns procariontes são capazes de utilizar o nitrogênio atmosférico através de um processo conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio, sendo responsável por contribuir em até 65% de todo o nitrogênio acumulado pelas plantas (ELSER et al., 2007).

Este processo é promovido biologicamente por meio de uma pequena parcela de procariontes que possuem a enzima nitrogenase, denominados fixadores de nitrogênio (diazotróficos) (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). Esse complexo enzimático é capaz de romper a tripla ligação existente na molécula de N_2 atmosférico em condições normais de temperatura e pressão, convertendo o N_2 atmosférico em NH_3 (amônia) que pode, então, tornar-se disponível para plantas (SARITA et al., 2008). Do grupo das bactérias promotoras de crescimento, assim como nos demais mecanismos de promoção de crescimento, podemos destacar os *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Rhizobium* (GIASSI; KIRITANI; KUPPER, 2016; ZAHOOR et al., 2014).

Em escala global, a demanda por N há muito tempo supera as quantidades consumidas de fósforo e potássio em cenários de produção agrícola. A alta exigência de nitrogênio pelas plantas cultivadas, sua mobilidade e dinâmica

complexa sem efeitos residuais das adubações, faz dele o nutriente mais limitante em paisagens agrícolas e naturais, tornando a adubação nitrogenada uma das mais difíceis e conseqüentemente uma das mais estudadas (ZAHOOR et al., 2014).

As interações entre raízes de plantas e microorganismos do solo são onipresentes em vários níveis tróficos e são um componente essencial da função do ecossistema (RICHARDSON et al., 2009). A simbiose de algumas bactérias com plantas da família botânica Leguminosae (Fabaceae) foram as pioneiras em estudos e compõe um grupo numeroso de espécies de importância econômica e ecológica (DESBROSSES; STOUGAARD, 2011; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). A inoculação de arroz e trigo com bactérias endofíticas tem mostrado resultados em ganhos significativos de produção e economia no uso de fertilizantes, chegando a acumular 20 a 30% do nitrogênio existente na parte aérea por esse processo (DE LIMA CANUTO et al., 2003).

A inoculação por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas fixadoras de nitrogênio biológico na cultura fornece uma abordagem integrada para gerenciamento de doenças, atividade de promoção de crescimento e manutenção do nível de nitrogênio em solo agrícola.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados dez isolados de *Bacillus* spp. (ACB-01, ACB-07, ACB-08, ACB-18, ACB-26, ACB-42, ACB-53, ACB-57, ACB-64 e ACB-AP3), todos pertencentes à Coleção de Microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC – Cordeirópolis, SP.

3.2 Ação dos isolados de *Bacillus* spp. como agentes promotores de crescimento *in vitro*

3.2.1 Produção de ácido indolacético (AIA)

Para verificar a produção de AIA, os isolados bacterianos foram, inicialmente, cultivados em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 100 ml contendo 50 mL do meio TSB 10% (15 g de triptona; 5 g de peptona de soja; 1 g de tritofano; 8 g NaCl; 1000 mL de água deionizada; pH 7,0). Cada frasco recebeu 1 mL de suspensão bacteriana ($1,0 \times 10^7$ células/mL) e, em seguida, as culturas foram mantidas sob agitação constante a 150 rpm durante 72 h 28°C. Após a incubação, uma alíquota de 2 mL de cada cultura foi submetida à centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, 1,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de reagente de Salkowski (7,5 mL de FeCl_3 0,5 M; 150 mL de H_2SO_4 concentrado; 250 mL de água destilada) (PATTEN; GLICK, 2002). Após 20 minutos de reação fez-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm (ASGHAR et al., 2002). Um meio sem a adição da suspensão da bactéria foi utilizado como testemunha.

Para a determinação da concentração de AIA, foi preparada uma curva de calibração com diferentes concentrações definidas de AIA comercial (0, 2, 4, 10, 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos e três repetições.

3.2.2 Solubilização de fosfato

Para a avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foi utilizada a metodologia descrita por Verma et al. (2001) e Rodríguez et al. (2000). As bactérias foram cultivadas em meio contendo fosfato insolúvel com algumas modificações (10 g de glicose; 5 g de NH_4Cl ; 1 g de NaCl; 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4 g de CaHPO_4 ; 15 g de ágar e pH 7,2; 1000 mL de água deionizada). Para o cultivo das bactérias no meio, uma alçada de cada bactéria foi retirada de colônia ativa e transferida para pontos marcados no meio contido em placa de Petri, sendo as culturas incubadas em estufa BOD a 28°C e fotoperíodo 12/12h. A avaliação foi determinada pela presença de um halo em torno da colônia, indicando a solubilização do fosfato, sendo os isolados avaliados após 10 dias.

A medida do diâmetro (\varnothing) do halo de solubilização, percebido como uma

área translúcida ao redor da colônia foi mensurada com a utilização de um paquímetro digital. A partir da obtenção da medida foi definido o índice de solubilização de fosfato (IS) de cada isolado por meio da fórmula: $IS = \frac{\varnothing \text{ Halo (mm)}}{\varnothing \text{ Colônia (mm)}}$, descrito por Hara e Oliveira (2004). De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), a solubilização foi classificada como baixa solubilização ($IS < 2$), média solubilização ($2 \geq IS \leq 3$) e alta solubilização ($IS > 3$). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos e três repetições.

3.2.3 Fixação biológica de nitrogênio

Para avaliar a fixação biológica de N, as bactérias foram cultivadas em tubos de ensaio de 20x70 mm, contendo 10 mL de meio de cultura FBN (fixação biológica de N) semissólido [5 g de ácido málico; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g de NaCl; 0,01 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 4 mL de Fe-EDTA (solução 1,64%); 2 mL por litro de azul de bromotimol (0,5%); 2 mL por litro de solução de micronutrientes (0,2 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0,235 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,28 g de H_3BO_3 ; 0,008 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1000 mL de água deionizada); 1,75 g por litro de ágar; pH 6,8] (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Cada tubo recebeu 0,5 mL de suspensão da bactéria (1×10^7 células/mL). Como controle, foi utilizado meio de cultura sem os isolados microbianos. As culturas foram então incubadas em estufa BOD a 28°C por sete dias (KUSS et al., 2007). Da cultura (meio + conteúdo celular) foram vertidos 10 mL em tubos, para digestão pelo método semi-micro Kjeldahl (MALAVOLTA et al., 1997).

Para digestão, foram adicionados a cada tubo com as células lisadas 0,7 g de mistura de digestão (100 g de Na_2SO_4 ; 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1 g de selênio em pó; 1 mL de H_2O_2 e 2 mL de H_2SO_4 , nesta ordem). Os tubos foram aquecidos em bloco digestor por 2 horas a 180°C e a temperatura então elevada para 360°C e, mantida até que a mistura apresentasse a cor verde-palha. Ao atingir a cor, aguardou-se que a temperatura da mistura reduzisse a aproximadamente 40°C, para se completar o volume com água destilada para

10 mL. Em seguida, foi realizada à destilação com NaOH e à titulação das soluções, para quantificação do nitrogênio total (Nt) (MALAVOLTA et al., 1997). O cálculo do Nt fixado foi apresentado em miligramas por litro de meio. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos e três repetições.

Os dados obtidos na etapa *in vitro* para avaliação da ação dos isolados de *Bacillus* spp. como agentes promotores de crescimento (item 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% probabilidade, utilizando o software estatístico AgroEstat (BARBOSA; MALDONADO, 2015).

3.3 Avaliação das bactérias para promoção de crescimento de mudas de tangor Murcott em diferentes porta-enxertos

Os ensaios foram realizados em casa de vegetação, com fotoperíodo natural e temperatura média variando ao longo do ano entre 11 a 30° C. As sementes de limão cravo e citrumelo Swingle e as borbulhas de Murcott foram obtidas do setor de borbulhas do Centro Avançado de Pesquisa de Citros Sylvio Moreira/IAC – Cordeirópolis, SP.

As mudas de cada porta-enxerto foram produzidas em tubetes de 50 cm³, utilizando substrato vegetal 'Plantmax', mantido sem esterilização e constituído de mesmo lote. A irrigação foi realizada de forma manual, a fim de se manter a capacidade de campo durante todo o desenvolvimento do projeto. Durante a condução do experimento, as plantas receberam duas soluções nutritivas as quais foram intercaladas a cada quinze dias, sendo: solução 1: nitrato de amônia 0,4 g; nitrato de cálcio 1,0 g; sulfato de zinco 0,006 g; sulfato de manganês 0,008 g; sulfato de cobre 0,008 g; sulfato de ferro 0,03 g; 1000 ml de água. Solução 2: nitrato de amônia 0,45 g; fosfato monoamônico 0,1 g; nitrato de potássio 0,51 g; sulfato de magnésio 0,83 g; sulfato de zinco 0,012 g; sulfato de ferro 0,03 g; 1000 ml de água.

Cada um dos dez isolados bacterianos estudado foi cultivado em placa de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), incubado em estufa para

BOD a 27°C, com fotoperíodo de 12/12h, por 48 horas. Posteriormente, foram adicionados 15 mL de água destilada e estéril em cada placa de Petri contendo a cultura bacteriana, para raspagem da colônia por meio de uma alça de platina. Obtida a suspensão bacteriana, fez-se o ajuste, com auxílio da câmara de Neubauer, para uma concentração de 1×10^7 células/mL.

Os tubetes referentes a cada porta-enxerto receberam 5 mL de suspensão (1×10^7 células/mL) de cada isolado bacteriano, sendo aplicados no entorno do colo do caule, em três diferentes momentos, na semeadura, 60 e 120 dias após a semeadura. Como testemunha, foram utilizadas plantas tratadas com água no lugar da suspensão bacteriana.

Após 120 dias da semeadura, as mudas foram transplantadas para sacolas com 3 L do mesmo substrato sem esterilização. Quando as mudas estavam com 180 dias, 240 dias e 300 dias, após a semeadura, as mesmas foram tratadas com 50mL de suspensão bacteriana (1×10^7 células/mL) de cada tratamento, sendo dessa vez aplicado a cerca de 3 cm do entorno do caule. Foi avaliada a altura do porta-enxerto aos 60, 120, 240 e 300 dias após a semeadura.

Com 300 dias após a semeadura, foi realizada a enxertia das mudas com o Tangor Murcott através da técnica de borbúlia do "T" invertido e, então aplicado da mesma forma os isolados bacterianos, aos 360, 390, 420 e 450 dias após a semeadura. Com 480 dias, os parâmetros de promoção de crescimento avaliados foram: altura total, altura da planta a partir da enxertia, comprimento da raiz, número de folhas, massa de matéria fresca da raiz e parte aérea e massa de matéria seca da parte aérea.

O crescimento dos porta-enxertos e das mudas de tangor Murcott foram avaliados em esquema fatorial, com dois fatores, sendo o fator A os isolados bacterianos mais a testemunha e o fator B os porta-enxertos, em um delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma planta. Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) respeitando o esquema fatorial, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade por meio do software estatístico AgroEstat (BARBOSA E MALDONADO, 2015).

4. RESULTADOS

4.1 Ação dos isolados de *Bacillus* spp. como agentes promotores de crescimento *in vitro*

4.1.1 Produção de ácido indolacético (AIA)

Todos os isolados bacterianos avaliados foram capazes de produzir AIA (Figura 1). Dentre estes isolados, o ACB-42 foi o que apresentou maior produção (118 mg/Kg), não diferindo estatisticamente dos isolados ACB-53 e ACB-08, com 113 e 111mg/Kg, respectivamente. O ACB-07 foi o que apresentou menor valor (40 mg/Kg) , não diferindo estatisticamente do ACB-57 (55 mg/Kg).

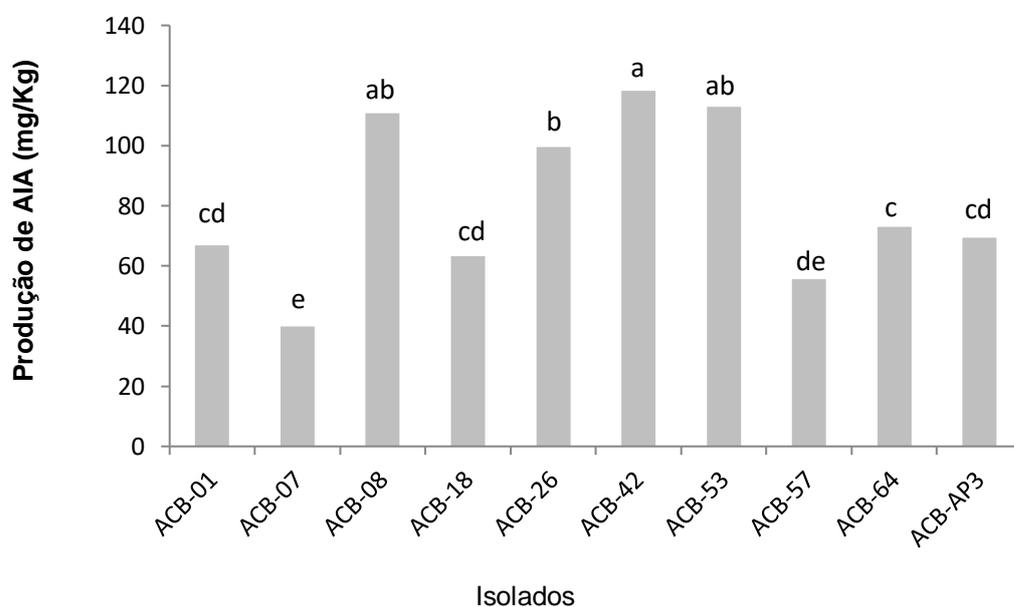


Figura 1- Produção de ácido indolacético (AIA) por diferentes isolados de *Bacillus* spp. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.1.2 Solubilização de fosfato

Todos os isolados bacterianos avaliados apresentaram capacidade de solubilizar fosfato em condições de laboratório, sendo que, os isolados ACB-53 e ACB-57 foram os que apresentaram maior índice de solubilização (IS=1,77 e 1,60, respectivamente), diferindo estatisticamente apenas do ACB-26 com IS=1,24 (Figuras 2 e 3). Destaca-se que, todos os isolados de *Bacillus* spp. apresentaram um baixo índice de solubilização (<2), seguindo os critérios de classificação de Silva Filho e Vidor (2000).

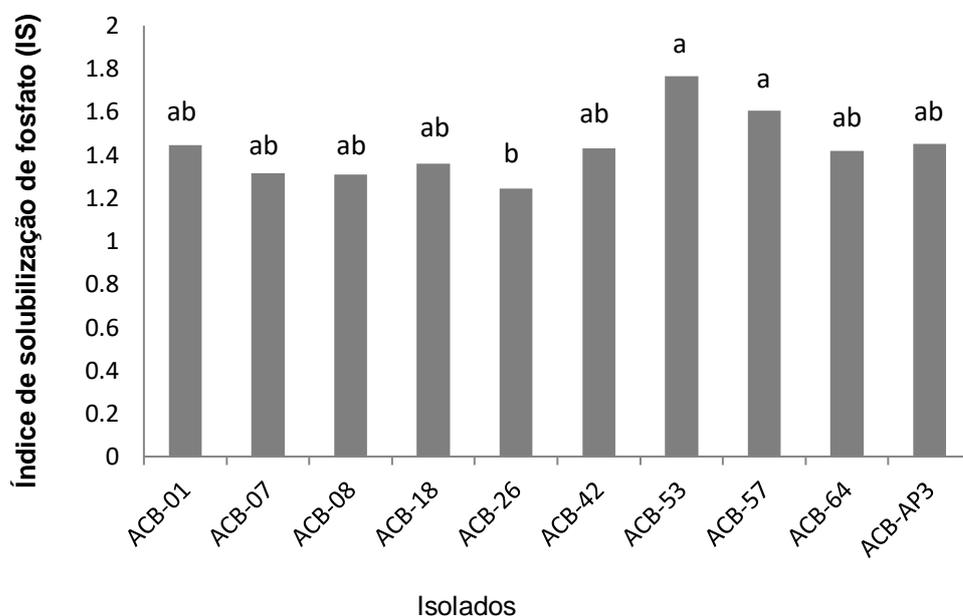


Figura 2 – Índice de solubilização de fosfato (IS= Diâmetro do halo (mm) / Diâmetro da colônia (mm)) por diferentes isolados de *Bacillus* spp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

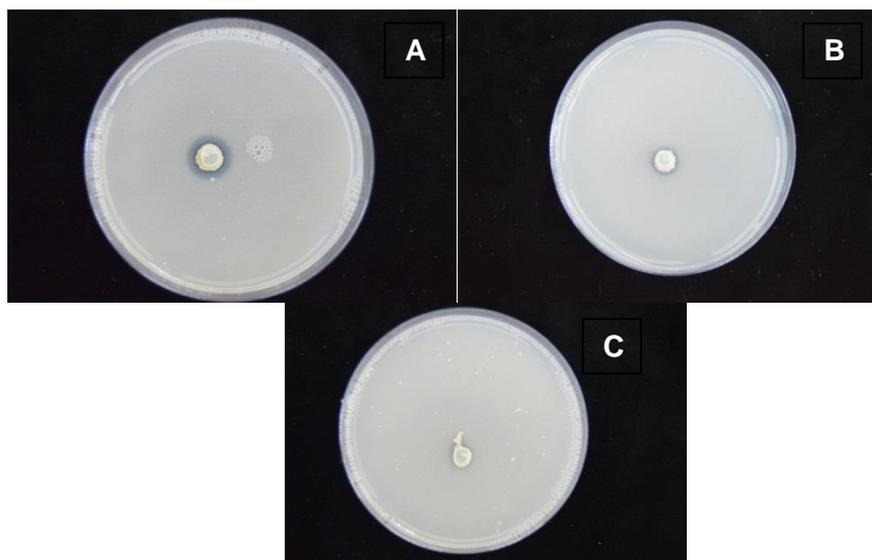


Figura 3 – Solubilização de fosfato pelos isolados ACB-53 (A), ACB-57 (B) e ACB-26 (C).

4.1.3 Fixação de nitrogênio

Quanto à capacidade de fixar nitrogênio, todos os isolados de *Bacillus* spp. estudados promoveram a fixação de nitrogênio, com valores de produção de nitrogênio total variando entre 15 (ACB-64) e 34 mg/L (ACB-01). Os isolados ACB-18, ACB-57 e ACB-AP3 não diferiram estatisticamente do valor observado para ACB-01 (Figura 4).

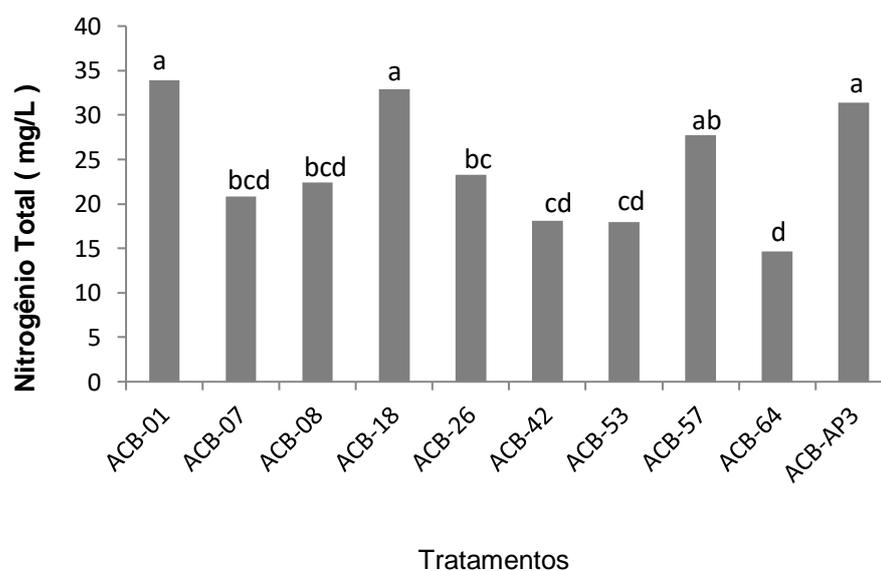


Figura 4 – Fixação de nitrogênio, avaliada pela quantificação do nitrogênio total (mg/L), por diferentes isolados de *Bacillus* spp. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Avaliação de *Bacillus* spp. como agentes promotores de crescimento de mudas de tangor Murcott

Os dados apresentados na Tabela 1 e ilustrados nas Figuras 5 e 6 mostram o efeito de diferentes isolados de *Bacillus* spp. na altura de plantas dos dois porta-enxertos utilizados para a produção de mudas de tangor Murcott, avaliados aos 60, 120, 240 e 300 dias após a semeadura. Verifica-se que aos 240 dias, com exceção dos isolados ACB-18, ACB-53 e ACB-AP3, os demais favoreceram o crescimento das plantas de citrumelo Swingle, diferindo estatisticamente da testemunha. Aos 300 dias os melhores resultados foram obtidos com o isolado ACB-07 que, com exceção do ACB-57, diferenciou-se de todos os demais isolados.

Para o porta-enxerto limão Cravo, não houve diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha, em todos os períodos avaliados. De maneira geral, quando se comparam as alturas dos dois porta-enxertos, independente dos tratamentos, as plantas de citrumelo Swingle apresentaram as maiores alturas (Tabela 1, Figuras 5 e 6).

Tabela 1. Altura da parte aérea da planta de citrumelo Swingle e limão cravo, após 60, 120, 240 e 300 dias da semeadura, sob influência de isolados bacterianos. Sw: Swingle; Cr: limão Cravo.

Trat.	Altura (cm)							
	60 dias		120 dias		240 dias		300 dias	
	Sw	Cr	Sw	Cr	Sw	Cr	Sw	Cr
Testemunha	3,50 bA ⁽¹⁾	5,16 aA	4,66 bA	7,00 aA	25,00 bA	27,66 aA	37,00 cA	31,33 aA
ACB-01	6,50 abA	3,16 aB	8,50 abA	3,83 aB	45,33 aA	34,66 aB	52,66 bcA	35,66 aB
ACB-07	5,33 abA	4,66 aA	6,00 abA	7,33 aA	49,00 aA	40,66 aA	77,00 aA	41,66 aB
ACB-08	5,83 abA	3,83 aA	7,16 abA	5,16 aA	46,33 aA	33,00 aB	53,00 bcA	48,66 aA
ACB-18	7,00 abA	5,00 aA	7,66 abA	5,00 aA	25,00 bA	28,66 aA	37,33 cA	35,66 aA
ACB-26	5,83 abA	3,33 aB	6,83 abA	4,66 aA	42,66 aA	32,16 aB	54,66 bcA	40,66 aB
ACB-42	7,16 abA	5,00 aA	8,16 abA	7,50 aA	42,00 aA	39,66 aA	54,00 bcA	42,66 aA
ACB-53	8,16 aA	3,66 aB	8,66 abA	4,66 aB	36,33 abA	32,16 aA	49,00 bcA	33,33 aB
ACB-57	7,16 abA	4,66 aB	8,00 abA	5,00 aB	49,16 aA	31,83 aB	60,33 abA	38,66 aB
ACB-64	8,00 aA	4,50 aB	9,33 aA	6,16 aB	46,00 aA	28,00 aB	56,00 bcA	32,00 aB
ACB-AP3	7,83 aA	4,00 aB	8,16 abA	4,83 aB	38,66 abA	27,66 aB	54,66 bcA	36,66 aB
CV%	25,06		25,53		14,17		16,36	

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 5 – Avaliação de *Bacillus* spp. para promoção de crescimento do porta-enxerto citrumelo Swingle.



Figura 6 – Avaliação de *Bacillus* spp. para promoção de crescimento do porta-enxerto limão Cravo.

Após a enxertia, ao se avaliar a altura total das plantas de tangor Murcott enxertadas sobre citrumelo Swingle, verifica-se que o ACB-07 (24,6 cm) foi o que apresentou o melhor resultado, não diferindo do tratamento com ACB-AP3 (23 cm) e ambos diferindo da testemunha (17 cm) . Quando se avalia a altura total das plantas de Tangor Murcott enxertadas sobre limão Cravo, os tratamentos que favoreceram o crescimento corresponderam aos ACBs: 08 (29,5 cm); 01 (28 cm); 42 (27 cm); 07 (24 cm); 53 (24 cm) e 57 (24 cm), que não diferriram entre si e diferiram estatisticamente do tratamento testemunha.

Ao se comparar as mudas de tangor Murcott em relação aos porta-enxertos, observa-se que houve mais tratamentos que favoreceram o crescimento das mudas, quando enxertadas em limão Cravo (Tabela 2).

Quando se avalia apenas a altura da planta, a partir da enxertia, ACB-07 foi o que proporcionou maior crescimento da planta, com um valor médio de 14 cm, diferindo da testemunha (6,7 cm), quando tangor Murcott foi enxertada sobre o porta-enxerto citrumelo Swingle. Enquanto que, os ACBs: 01, 08 e 42 favoreceram ao aumento da altura (a partir da enxertia) quando as plantas foram enxertadas sobre limão Cravo, com valores médios de 19, 20 e 17 cm, respectivamente, enquanto que a altura média das plantas do tratamento testemunha foi de 11 cm (Tabela 2).

De um modo geral, comparando os resultados entre os porta-enxertos, para os parâmetros altura total e altura a partir da enxertia, as mudas enxertadas em Limão Cravo apresentaram os melhores crescimentos.

Para o parâmetro comprimento de raiz avaliado (Tabela 2), os resultados mostraram que ACB-07 proporcionou um valor médio de comprimento de raiz em torno de 48 cm, diferindo da testemunha (36 cm), quando as plantas foram enxertadas em citrumelo Swingle, enquanto que, os ACBs 08 e 26 proporcionaram os maiores comprimentos de raízes, 50 e 49 cm, respectivamente, diferindo da testemunha (35 cm) em plantas de tangor Murcott enxertadas sobre limão Cravo. Quanto ao número de folhas, não houve diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha, independente do porta-enxerto em que as plantas de tangor Murcott foram enxertadas.

Os tratamentos com os isolados ACB-07 e ACB-26 proporcionaram os maiores valores (3,38g e 3,06g, respectivamente) de massa de matéria fresca da parte aérea diferindo estatisticamente do tratamento testemunha (2,23g), de plantas de tangor Murcott enxertadas em citreumelo Swingle, enquanto que, um aumento desse mesmo parâmetro avaliado foi obtido com o ACB-08 para as plantas enxertadas em limão Cravo. Quando se avaliou a massa de matéria fresca da raiz nas plantas de tangor Murcott enxertadas sobre citrumelo Swingle ou limão Cravo, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 2. Altura total, altura da muda a partir da enxertia, comprimento da raiz e número de folhas das plantas de tangor Murcott enxertadas sobre citrumelo Swingle e limão Cravo, sob influência de isolados de *Bacillus* spp.

Trat.	Altura Total (porta enxerto+enxerto)		Altura da muda a partir da enxertia		Raiz		Nº Folhas	
	(cm)		(cm)		(cm)			
	Sw	Cr	Sw	Cr	Sw	Cr	Sw	Cr
Testemunha	16,83 cdA ⁽¹⁾	16,33 cA	6,70 bcB	11,16 dA	36,36 abA	34,6 bA	5,75 aA	7,50 abA
ACB-01 ⁽²⁾	18,80 abcdB	27,83 abA	8,03 bcB	18,86 abA	41,00 abA	43,66 abA	6,50 aA	8,50 abA
ACB-07	24,60 aA	24,00 abA	14,20 aA	12,93 cdA	48,36 aA	38,00 abB	9,75 aA	7,00 bB
ACB-08	22,20 abcB	29,50 aA	11,50 abB	20,33 aA	43,50 abA	50,33 aA	6,25 aB	9,00 abA
ACB-18	13,73 dB	23,16 bA	4,46 cB	13,83 bcdA	32,13 bB	42,00 abA	6,00 aB	9,50 abA
ACB-26	22,66 abcA	22,16 bcA	12,36 abA	12,53 cdA	40,50 abB	49,33 aA	7,25 aA	8,25 abA
ACB-42	22,40 abcB	26,90 abA	12,03 abB	17,46 abcA	44,83 abA	34,16 bB	7,00 aB	11,50 aA
ACB-53	18,00 bcdB	24,00 abA	7,10 bcB	13,66 bcdA	45,33 abA	39,50 abA	6,00 aA	7,75 abA
ACB-57	18,20 bcdB	23,83 abA	8,03 bcB	13,66 bcdA	40,66 abA	31,33 bB	6,00 aB	8,75 abA
ACB-64	21,86 abcA	23,36 bA	11,20 abB	14,86 abcdA	44,50 abA	38,00 abA	7,00 aA	7,25 bA
ACB-AP3	22,86 abA	22,00 bcA	12,36 abA	13,33 bcdA	38,33 abA	40,50 abA	8,00 aA	8,75 abA
CV%	9,77		16,92		11,93		20,91	

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Massa de matéria fresca da parte aérea e raiz e massa de matéria seca da parte aérea das plantas de tangor Murcott enxertadas sobre citrumelo Swingle e limão Cravo, sob influência de isolados de *Bacillus* spp.

Trat.	Massa de matéria fresca (g)						Massa de matéria seca (g)	
	Parte aérea*		Raiz*		Total*		Parte aérea	
	Sw	Cr	Sw	Cr	Sw	Cr	Sw	Cr
Testemunha	2,23 cdA ⁽¹⁾	2,42 bA	4,38 abcA	4,11 aA	3,94 cA	4,74 aA	1,83 bA	1,99 aA
ACB-01	2,84 abcA	3,00 abA	4,96 abA	4,31 aA	5,68 abA	5,21 aA	1,89 bA	2,06 aA
ACB-07	3,38 aA	2,72 abA	5,44 aA	5,01 aA	6,37 aA	5,88 aA	2,48 abA	2,22 aA
ACB-08	2,80 abcdB	3,29 aA	4,45 abcA	4,51 aA	5,24 abcA	5,55 aA	2,06 bA	1,91 aA
ACB-18	2,04 dB	2,68 abA	2,72 cB	4,57 aA	3,34 cB	5,25 aA	1,96 bA	1,83 aB
ACB-26	3,06 abA	2,47 bB	4,41 abcA	3,45 aA	5,33 abcA	4,19 aA	2,07 bA	1,62 aB
ACB-42	2,72 abcdA	3,10 abA	4,07 abcA	4,36 aA	4,85 acbA	5,31 aA	2,25 abA	2,12 aA
ACB-53	2,37 bcdA	2,72 abA	3,20 bcA	3,98 aA	3,93 bcA	4,78 aA	1,97 bA	1,89 aB
ACB-57	2,48 bcdA	2,80 abA	3,65 abcA	4,35 aA	4,36 abcA	5,13 aA	2,02 bA	1,98 aA
ACB-64	2,75 abcdA	2,52 bA	4,81 abcA	3,47 aB	5,51 abA	4,24 aB	2,12 bA	1,76 aA
ACB-AP3	2,87 abcA	2,63 abA	4,47 abcA	3,77 aA	5,28 abcA	4,54 aA	1,90 bA	1,89 aA
CV%	10,46		17,98		14,96		11,63	

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Dados transformados $\sqrt{x} + 0,5$

5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que todos os isolados de *Bacillus* spp. foram capazes de produzir ácido indolacético (AIA), sendo as maiores quantidades obtidas pelos isolados ACB-42, ACB-53 e ACB-08 (118, 113 e 111mg/Kg, respectivamente). Dados similares foram obtidos por Leoncio e Botelho (2017), que ao estudarem o potencial de diferentes espécies de bactérias como indutoras de crescimento vegetal de alho (*Allium sativum*), verificaram que grande parte (82%) dos isolados foi capaz de sintetizar AIA. Bhutani et al. (2018) relataram que bactérias do gênero *Bacillus* spp. produziram AIA, sob condições de laboratório e, Giassi et al. (2016) encontraram resultados positivos para a produção desse hormônio por diferentes espécies de bactérias, inclusive por *Bacillus* spp..

É importante observar que os isolados ACB-08 e ACB-42 apresentaram as maiores produções de AIA e promoveram maiores alturas em mudas de tangor Murcott enxertadas em limão Cravo. Moreira e Araújo (2013) ao estudarem possíveis agentes promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis* verificaram que isolados de *Bacillus* spp. foram grandes produtores de auxinas. No entanto, embora esse hormônio tenha a capacidade de induzir a promoção de crescimento de plantas, vários fatores fisiológicos podem afetar sua síntese, quando em contato com a raiz da planta (WAGI; AHMED, 2019). Para Pilet (1979), a resposta do hormônio depende do estágio de desenvolvimento da raiz, a qual pode influenciar na composição e na quantidade dos exsudatos liberados pela mesma. Para Araujo e Guerreiro (2010), a capacidade de microrganismos em produzir grandes quantidades de AIA *in vitro*, não é, necessariamente, o fator primordial para que o crescimento de plantas ocorra, uma vez que, o efeito benéfico depende, também, da concentração presente. Segundo os autores, baixas concentrações de AIA podem até estimular o crescimento de raízes, enquanto que, altas concentrações podem apresentar um efeito inibitório no crescimento das plantas. Um exemplo, apresentado neste estudo, diz respeito, ao ACB-07, em plantas de citrumelo Swingle, que possivelmente por produzir baixa concentração de AIA tenha provocado um maior desenvolvimento da planta.

Os resultados obtidos na etapa realizada *in vitro*, em que foi avaliada a

capacidade dos isolados de *Bacillus* spp. em produzir AIA, solubilizar P e fixar N, também, ajuda a compreender o potencial dos isolados de *Bacillus* para promoção de crescimento de mudas de Murcott. No entanto, nem sempre os isolados que apresentam traços de promoção de crescimento *in vitro* apresentaram potencial como promotores de crescimento de plantas sob condições de casa-de-vegetação. Um exemplo, é o isolado ACB-53 que apresentou maior produção de AIA, maior índice de solubilização de fosfato e maior fixação de nitrogênio, porém, quando em condições de casa-de-vegetação, não teve um bom desempenho na promoção de crescimento de plantas de tangor Murcott. Resultado semelhante foi obtido por Rodrigues et al. (2016), segundo os autores um isolado de *Klebsiella* sp. (KRC 2.2) promoveu o maior crescimento de plantas de milho, porém, os parâmetros de crescimento avaliados *in vitro* não apresentaram os melhores resultados. Por outro lado, Grobelak (2015), verificou que alguns dos microrganismos testados, que produziram altos valores de AIA *in vitro*, também, promoveram os maiores crescimentos em plantas de milho. Segundo esses autores, a solubilização de fosfato, também, variou entre os microrganismos que aumentaram o crescimento das plantas.

De acordo com Giassi et al. (2016), os isolados de *Bacillus* spp. BM16 e CPMO4 foram capazes de promover maior crescimento do porta-enxerto citrumelo Swingle, quando comparado com os porta-enxertos limão Cravo e tangerina Sunki. Neste aspecto, diversas pesquisas têm demonstrado que as interações entre planta e microrganismos dependem de ações específicas, que podem resultar em modulações na fisiologia e morfologia das plantas (PHILIPPOT et al., 2013), assim como, os exsudatos produzidos pelas raízes podem ter grande influência na microbiota da rizosfera (KAWASAKI et al., 2016).

Após realizar a enxertia, utilizando duas variedades de porta-enxertos para a produção de mudas de tangor Murcott, foi possível observar uma nova dinâmica na relação planta – microrganismo. Embora possa ocorrer uma incompatibilidade entre o porta-enxerto citrumelo Swingle e a copa de tangor Murcott, tal fato não afetou a realização das avaliações. Essa relação apresenta diversas possibilidades de interação e fatores que podem influenciar no desenvolvimento da planta. As diferentes espécies de microrganismos

presentes na rizosfera, o tipo de solo, disponibilidade de nutrientes, podem influir tanto positiva quanto negativamente. Em estudo realizado em diferentes períodos com soja e alfafa, verificou-se grandes diferenças nos seus rizomicrobiomas, demonstrando que os estágios vegetativos podem influenciar nas espécies de microrganismos que irão interagir com a planta (XIAO et al., 2017).

As mudas enxertadas sobre limão Cravo e tratadas com ACB-08, apresentaram as maiores alturas e comprimento de raízes, mostrando que esse isolado tem potencial como agente promotor de crescimento de plantas de tangor Murcott, assim como o ACB-07 que apresentou um efeito positivo para o crescimento de mudas de tangor Murcott, quando enxertadas em citrumelo Swingle e de acordo com a maioria dos parâmetros avaliados (altura total; altura a partir da enxertia; comprimento da raiz e massa verde da parte aérea). No entanto, o isolado ACB-07 apresentou o pior índice para produção de AIA *in vitro*. Estudo desenvolvido por Grobelak et al. (2015) não corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, em que os autores avaliaram a capacidade de isolados de bactérias em promover crescimento em plantas de *Brassica napus* e *Festuca ovinia* e, verificaram que os maiores valores de comprimento do broto foram proporcionados por plantas tratadas com isolados de *Bacillus*, assim como interações semelhantes foram observadas para o comprimento das raízes. O efeito do alongamento da raiz e do caule em comparação com os controles foi o resultado da produção de AIA pelas cepas especificadas, as quais apresentaram os maiores valores deste fito hormônio.

A concentração de AIA ainda apresenta resultados e consequências variadas. Araujo e Guerreiro (2010) apresentaram resultados em que os isolados de *Bacillus* utilizados que mais produziram AIA, não foram capazes de promover crescimento em plantas de *Zea mays*. A partir desses estudos, é importante ressaltar que a produção de AIA, pelas bactérias promotoras de crescimento de plantas, é regulada por vários fatores, como as espécies bacterianas, cepas, concentração do precursor, componentes do meio, estágio de crescimento, entre outros (JASIM et al., 2014).

Embora ainda necessite de mais pesquisas, estudos apontam que as interações entre as raízes das plantas e o AIA bacteriano podem ocorrer devido à estimulação direta do alongamento ou divisão celular da planta e

indiretamente por influenciar a atividade da enzima Aminociclopropano-carboxilato (ACC) desaminase bacteriana. A ACC desaminase hidrolisa o ACC exsudado pela planta, o qual é o precursor imediato do fito hormônio etileno, evitando assim a inibição do crescimento da planta pelo nível de etileno produzido (ACHARD et al., 2006). Apesar da sua relativa abundância, diversos estudos apontam que em organismos do mesmo gênero e espécie a sua distribuição não é uniforme, ou seja, algumas estirpes possuem e outras não (BLAHA et al., 2006; OROZCO-MOSQUEDA; GLICK; SANTOYO, 2020). Esse fator pode estar diretamente relacionado com os diferentes resultados de promoção de crescimento obtidos quando se relaciona o AIA produzido *in vitro* e os resultados obtidos *in vivo*.

A importância do fósforo para o desenvolvimento de plantas é amplamente conhecido. No entanto, esse nutriente geralmente não está biologicamente disponível, uma vez que as raízes produzem uma quantidade muito baixa da enzima fitase, responsável pela decomposição do fosfato, que torna o fósforo disponível para a planta (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017). Em solos ácidos ou básicos, o fósforo disponível, geralmente é reduzido nas raízes das plantas, devido à forte ligação do elemento com cálcio e magnésio. No entanto, certas enzimas, que são secretadas por isolados bacterianos no solo, podem quebrar essa ligação, através da acidificação das células microbianas em seus arredores, liberando os íons de fosfato e, conseqüentemente, ajudando na disponibilidade do fósforo para as plantas (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017; SOLANKI; KUNDU; NEHRA, 2018). Embora todos os isolados bacterianos testados, neste estudo, apresentassem capacidade de solubilizar fosfato, somente ACB-53 foi capaz de atingir um índice de solubilização próximo de 2, ainda assim, um índice considerado baixo de acordo com os critérios de classificação adotados por Silva Filho e Vidor (2000). Os resultados obtidos neste estudo corroboram com Giassi et al. (2016), que relataram a baixa solubilização de fosfato por isolados de *Bacillus* spp.

Dentre os isolados que apresentaram maior solubilização de fosfato, ACB-53 e ACB-57, nenhum apresentou crescimento de muda, tão pouco demonstrou maior crescimento do enxerto. Embora estudos apontem a capacidade de bactérias do solo em solubilizar e mineralizar fosfato, incluindo

Pseudomonas spp, *Agrobacterium* spp. e várias espécies de *Bacillus* (BABALOLA; GLICK, 2012; GIASSI; KIRITANI; KUPPER, 2016), os fungos do solo são capazes de distribuir-se em distâncias maiores mais facilmente do que as bactérias e podem ser mais importantes para a solubilização de fosfato inorgânico em solos, devido a sua capacidade em produzir e secretar mais ácidos, como glucônico, cítrico, láctico, 2-cetoglucônico, oxálico, ácido tartárico e acético, do que as bactérias (SHARMA et al., 2013).

A fixação biológica do nitrogênio é realizada por vários grupos de microrganismos que são capazes de absorver o nitrogênio elementar da atmosfera, através da produção da enzima nitrogenase, a qual catalisa e converte o dinitrogênio molecular (N₂) em amônia (NH₃), que é posteriormente capturado pelas raízes das plantas e assimilado em aminoácidos (MUS et al., 2016). Diversas espécies de *Bacillus*, como *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subterraneus*, *B. aquimaris*, *B. vietnamensis* e *B. aerophilus* são conhecidos por fixar nitrogênio atmosférico (DING et al., 2015; YOUSUF et al., 2017).

Em estudo desenvolvido por Yousuf et al. (2017), 18 variedades de *Bacillus* foram avaliados quanto a sua capacidade em fixar nitrogênio. Assim, como em nosso estudo, todos os isolados foram capazes de fixar nitrogênio, com uma grande variação de um para o outro. Essa variação e a inibição da taxa de fixação de nitrogênio entre diferentes cepas de bactérias podem ser influenciadas por vários fatores físicos como luz, temperatura e variações sazonais (BASKAR; PRABAKARAN, 2015).

Segundo He et al. (2019), ao avaliarem diferentes espécies de *Bacillus* e sua capacidade de fixar nitrogênio, verificaram grande variação em termos de produção de nitrogênio fixado pela bactéria, como ocorreu no respectivo estudo. Nos estudos de Giassi et al. (2016) foi verificadas variações na resposta da fixação do nitrogênio pelas diferentes espécies de bactérias avaliadas.

Os isolados ACB-01, ACB-18, ACB-57, ACB-AP3, quanto à sua capacidade em fixar nitrogênio *in vitro*, apresentaram os melhores resultados. No entanto, ao comparar sua capacidade em promover crescimento da muda de Murcott e fixar nitrogênio, os resultados foram diversos. Embora algumas espécies de *Bacillus* tenham a capacidade de fixar nitrogênio e promover o crescimento de biomassa (MADHAIYAN et al., 2011), outras podem apresentar

baixa fixação de nitrogênio em condições de laboratório e promover crescimento em campo (GIASSI; KIRITANI; KUPPER, 2016). Muitas bactérias associadas a plantas são bem conhecidas por sua capacidade de conferir a promoção do crescimento das e aumentar a resistência a várias doenças, bem como a estresses abióticos. No entanto, ainda é necessário conferir e pesquisar esses efeitos benéficos quando aplicados no campo, o que muitas vezes se diferenciam devido à colonização insuficiente de rizo e / ou endosfera (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

Giassi et al. (2016) observou que a promoção de crescimento das plantas cítricas pelos diferentes microrganismos avaliados, dependeu do genótipo da planta. Dessa forma, diferentes microrganismos obtiveram diferentes resultados a depender do porta-enxerto tratado. Em nosso estudo, as plantas e isolados se comportaram da mesma forma. Os isolados ACB-01 e ACB-08 foram capazes de promover o crescimento de Murcott sobre Limão Cravo. Enquanto que, as plantas enxertadas sobre Swingle, os melhores resultados foram obtidos com o tratamento ACB-07 e ACB-AP3.

A interação entre plantas e microrganismos, como observamos no presente trabalho, possui diversos fatores que podem implicar em seu sucesso ou fracasso. O processo de enxertia, também pode interferir positiva ou negativamente nessa associação. Em estudo desenvolvido por Padró et al. (2021), foi avaliado o efeito do *B. subtilis* nas atividades de enzimas antioxidantes na enxertia de tomate, e notou-se que a aplicação *in vivo* desta cepa na enxertia de tomateiro, mostrou um relevante efeito da atividade enzimática e do nível de fenóis totais imediatamente após a enxertia, bem como nas demais etapas do período de recuperação do enxerto quando o estresse oxidativo pode estar associado à reconexão do tecido vascular. Além disso, observou-se que a capacidade da bactéria de diminuir ou aumentar a atividade enzimática e o nível de fenóis totais nas plantas, também, depende da combinação do enxerto compatibilidade do enxerto.

Diversos autores apontam que a colonização dos microrganismos na rizosfera e as associações entre plantas e bactérias podem envolver interações específicas (ZHANG et al., 2018) e que as diferentes composições dos exsudatos de raízes podem influenciar essa interação (VIVES-PERIS et al., 2018). A liberação de exsudatos pelas raízes é altamente influenciada por

vários fatores bióticos e abióticos no ambiente, o que pode levar a uma mudança significativa na microbiota da rizosfera (KAWASAKI et al., 2016). Os compostos liberados pelas plantas através de suas raízes constituem-se principalmente de carbono, nitrogênio e açúcares, além de fitos hormônios e aminoácidos que podem ser atrativos ou deletérios aos microrganismos ali presentes (KAWASAKI et al., 2016; MOE, 2013). Existem poucas informações sobre a colonização de bactérias e interação com exsudatos na rizosfera de diferentes genótipos de plantas cítricas, no entanto Vives-Peris et al. (2018) apontaram que exsudatos de raízes de plantas cítricas podem moldar o crescimento das rizobactérias sob condições de estresse abiótico, e a partir da seleção de espécies com potencial para essa interação, obter microrganismos com maior potencial para promoção de crescimento. Outro componente presente nos exsudatos radiculares que varia muito entre espécies de plantas é o triptofano, o qual tem sido identificado como o principal precursor da biossíntese de AIA em bactérias. Segundo Spaepen et al. (2007), essa interação entre os exsudatos de cada porta-enxerto com cada espécie de bactéria podem explicar a variação nos resultados obtidos.

Mais estudos envolvendo a relação entre a produção de AIA e fixação de nitrogênio por bactérias do gênero *Bacillus* spp. devem ser realizados, uma vez que, no presente estudo os isolados que mais produziram AIA foram os que menos fixaram nitrogênio e vice-versa. Além disso, devido aos diferentes processos envolvidos na interação planta-microrganismos, novos estudos devem ser realizados, principalmente, no que se refere à preferência dos microrganismos por determinados exsudatos de plantas, de modo que possa auxiliar na seleção de espécies bacterianas, como agentes promotores de crescimento de plantas.

6 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

- a) Todos os isolados bacterianos avaliados foram capazes de produzir AIA, solubilizar fostato e fixar nitrogênio, sob condições de laboratório;
- b) O isolado de *Bacillus* spp. ACB-07 favoreceu o crescimento de mudas de

tangor Murcott enxertadas em citrumelo Swingle;

c) *Bacillus* spp. ACB-08 apresentou potencial, como agente promotor de crescimento, em mudas de tangor Murcott enxertadas em Limão Cravo;

d) A habilidade de um isolado bacteriano em promover o crescimento de mudas de tangor Murcott depende, dentre outros fatores, da variedade do porta-enxerto tilizado.

7 LITERATURA CITADA

- ABOBATTA, W. F. Citrus Varieties in Egypt: An Impression ARTICLE INFORMATION. **International Research Journal of Applied Sciences Short Communication**, p. 2663–5585, 2019.
- ACHARD, P. et al. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. **Science**, v. 311, n. 5757, p. 91–94, 2006.
- AHMAD, F.; IQBAL, A.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, p. 173–181, 2008.
- ALMONEAFY, A. A. et al. Tomato plant growth promotion and antibacterial related-mechanisms of four rhizobacterial *Bacillus* strains against *Ralstonia solanacearum*. **Symbiosis**, v. 63, n. 2, p. 59–70, 2014.
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2017.
- ANAND, K.; KUMARI, B.; MALLICK, M. A. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 37–40, 2016.
- ANDREOTE, F. D.; PEREIRA E SILVA, M. DE C. Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 29–34, 2017.
- ARAUJO, F. F. DE; GUERREIRO, R. T. Bioprospection of *Bacillus* isolates promoters of corn growth in natural and sterile soil. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 837–844, 2010.
- ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 231–237, 2002.
- BABALOLA, O. O.; GLICK, B. R. The use of microbial inoculants in African agriculture: Current practice and future prospects. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 10, n. 3–4, p. 540–549, 2012.
- BARBOSA, J.C., MALDONADO, JR., W. 2015. Experimentação agrônômica & AgroEstat: Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos, Jaboticabal: gráfica multipress Ltda, p. 396.
- BASKAR, B.; PRABAKARAN, P. Assessment of nitrogen fixing bacterial community present in the rhizosphere of *Avicennia marina*. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 44, n. 3, p. 318–322, 2015.
- BASTOS, D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuários**, v. 35, p. 36–45, 2014.
- 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, 2017.

BETTIOL, W. et al. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. **EMBRAPA - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 1, p. 155, 2012.

BHUTANI, N. et al. Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 65, n. 1–2, p. 83–96, 2018.

BLAHA, D. et al. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, n. 3, p. 455–470, 2006.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOVACS, A. T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 15–25, 2021.

CAGED - Cadastro Geral de Empregados e Desempregados. Vínculos empregatícios relacionados à citricultura. Disponível em: < <http://pdet.mte.gov.br/novo-caged> > Acesso em: 01 de out. 2021.

CAPORAL, F. R. Extensão Rural, DEAER – CCR – UFSM, Santa Maria, v.27, n.3, jul./set. 2020. v. 27, n. 3, p. 7–19, 2020.

CARVALHO, S. A. DE et al. Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 6, p. 1–36, 2019.

CASTLE, W. S. A Career Perspective on Citrus Rootstocks , Their Development , and Commercialization. **American Society for Horticultural Science**, v. 45, n. 1, p. 11–15, 2010.

CHEN, K. et al. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. **Biological Control**, v. 151, n. August, p. 104419, 2020.

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**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra Brasileira de laranja. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-laranja>> Acesso em: 01 de out. 2021.

CORNILLE, A. et al. Genetic structure and domestication history of the grape. **Nature**, v. 24, n. 7, p. 3530–3535, 2011.

CORNILLE, A. et al. New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 5, p. 13, 2012.

DE ARAUJO, F. F. Seed inoculation with *Bacillus subtilis*, formulated with oyster meal and growth of corn, soybean and cotton. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p.

456–462, 2008.

DEFESA AGROPECUÁRIA ESTADO DE SÃO PAULO. Portaria para viveiros de mudas cítricas no Estado de São Paulo. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-cda-17-de-05-de-abril-de-2018,1158.html>> Acesso em: 01 de out. 2021.

DE LIMA CANUTO, E. et al. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 62–64, 2003.

DE SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419, 2015.

DE SOUZA, R. S. C. et al. Genome Sequences of a Plant Beneficial Synthetic Bacterial Community Reveal Genetic Features for Successful Plant Colonization. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

DE VRIES, F. T. et al. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 2092–2103, 2006.

DESBROSSES, G. J.; STOUGAARD, J. Root nodulation: A paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 4, p. 348–358, 2011.

DING, X. et al. Spatial distribution of bacterial communities driven by multiple environmental factors in a beach wetland of the largest freshwater lake in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. FEB, p. 1–10, 2015.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas**. Itaguaí, RJ: [s.n.], 1995.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.

ELSER, J. J. et al. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 10, n. 12, p. 1135–1142, 2007.

ERNESTO MÉNDEZ, V.; BACON, C. M.; COHEN, R. Agroecology as a transdisciplinary, participatory, and action-oriented approach. **Agroecology and Sustainable Food Systems**, v. 37, n. 1, p. 3–18, 2013.

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, n. March, p. 225–246, 2018.

FALKOWSKI, P. G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean. **Nature**, v. 387, p. 272–274, 1997.

FERNANDEZ, T. A. et al. Potencial Multifuncional de Isolados de de *Bacillus thuringiensis* para Controle de Fungos Fitopatogênicos e Promoção de Crescimento

- Vegetal. **EMBRAPA - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 1, p. 31, 2019.
- FERREIRA, E. P. DE B.; STONE, L. F.; MARTIN-DIDONET, C. C. G. Population and microbial activity of the soil under an agro-ecological production system. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 1, p. 22–31, 2017.
- GIASSI, V.; KIRITANI, C.; KUPPER, K. C. Bacteria as growth-promoting agents for citrus rootstocks. **Microbiological Research**, v. 190, p. 46–54, 2016.
- GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 15, 2012.
- GOMES, E. A. et al. Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Milho e Sorgo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **EMBRAPA - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 1, p. 51, 2016.
- GROBELAK, A.; NAPORA, A.; KACPRZAK, M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 22–28, 2015.
- HARA, F. A. DOS S.; OLIVEIRA, L. A. DE. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álidos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 3, p. 343–357, 2004.
- HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.
- HE, Y. et al. Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 1, p. 196–207, 2019.
- HLPE. Food Security and Nutrition: Building a Global Narrative towards 2030. **High Level Panel of Experts**, p. 112, 2020.
- HU, J. et al. Probiotic *Pseudomonas* communities enhance plant growth and nutrient assimilation via diversity-mediated ecosystem functioning. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 113, p. 122–129, 2017.
- IQBAL, M.; WAGI, S.; AHMED, A. Phyllospheric Bacterial Treatments Improve Growth in *Helianthus annuus* L. **RADS Journal of Biological Research & Applied Sciences**, v. 9, n. 1, p. 30–40, 2018.
- JASIM, B. et al. Studies on the factors modulating indole-3-acetic acid production in endophytic bacterial isolates from *Piper nigrum* and molecular analysis of ipdc gene. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 786–799, 2014.
- KALAKI, R. B.; NEVES, M. F. Plano estratégico para o sistema agroindustrial citrícola brasileiro. **Gestão & Produção**, v. 24, n. 2, p. 338–354, 2017.
- Kupper, K.C.; Gimenes-Fernandes, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. *Summa Phytopathologica*, v. 28, n.3, p. 292-295, 2002.

- KAWASAKI, A. et al. Microbiome and exudates of the root and rhizosphere of *brachypodium distachyon*, a model for wheat. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, 2016.
- KUSS, A. V. et al. Nitrogen fixation and in vitro production of indolacetic acid by endophytic diazotrophic bacteria. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, 2007.
- LEONCIO, M. DA R.; BOTELHO, G. R. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria isolated from garlic (*Allium sativum*). **Revista Scientia Agraria**, v. 18, n. 3, p. 95–106, 2017.
- LOPES, M. J. DOS S. L. et al. Biotecnologia microbiana : inoculação , mecanismos de ação e benefícios às plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2021.
- MADHAIYAN, M. et al. *Bacillus rhizosphaerae* spp. nov., an novel diazotrophic bacterium isolated from sugarcane rhizosphere soil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 437–444, 2011.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações, 2ª ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.
- MATSUDA, R. et al. Production of indoleacetic acid by strains of the epiphytic bacteria *Neptunomonas* spp. isolated from the red alga *Pyropia yezoensis* and the seagrass *Zostera marina*. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 2, p. 255–265, 2018.
- MEENA, V. S. et al. Can *Bacillus* Species Enhance Nutrient Availability in Agricultural Soils? **Bacilli and Agrobiotechnology**, p. 367–395, 2016.
- MIKE-ANOSIKE, E. E.; BRAIDE, W.; ADELEYE, S. A. Studies on Indole Acetic Acid (IAA) Production by Rhizobacteria and Growth promoting potentials. **International Journal of Advanced Resaerch in Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 133–140, 2018.
- MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The significance of *Bacillus* spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–19, 2020.
- MILLER, S. H. et al. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 3, p. 403–411, 2010.
- MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 11, p. 3075–3084, 2013.
- MOE, L. A. Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1692–1705, 2013.
- MOHAMMED, B. L.; HUSSEIN, R. A.; TOAMA, F. N. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. **Energy Procedia. Anais...Elsevier B.V.**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.178>>
- MOREIRA, A. L. DE L.; DE ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. Como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Arvore**, v. 37, n. 5, p. 933–943, 2013.

- MUS, F. et al. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698–3710, 2016.
- NICHOLLS, C. I.; ALTIERI, M. A. Bases agroecológicas para la adaptación de la agricultura al cambio climático. **UNED Research Journal**, v. 11, n. 1, p. S55–S61, 2019.
- OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 1–16, 2017.
- OLIVEIRA, A. L. M. DE; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **EMBRAPA - SPI**, p. 40, 2003.
- OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL C.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. **Microbiological Research**, v. 235, n. February, p. 10, 2020.
- PACHECO, C. DE A. et al. Fremont mandarin: Fruit with a long shelf life for the fresh fruit market. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 45, p. 4600–4609, 2016.
- PADRÓ, M. D. A. et al. Effect of *Bacillus subtilis* on antioxidant enzyme activities in tomato grafting. **PeerJ**, v. 9, p. 1–28, 2021.
- PANTANO, G. et al. Sustainability in phosphorus use: A question of water and food security | Sustentabilidade no uso do fósforo: Uma questão de segurança hídrica e alimentar. **Química Nova**, v. 39, n. 6, p. 732–740, 2016.
- PARK, S. H. et al. Adventitious root formation of in vitro peach shoots is regulated by auxin and ethylene. **Scientia Horticulturae**, v. 226, n. June, p. 250–260, 2017.
- 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.
- PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**. Nature Publishing Group, , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3109>>
- PILET, P. E.; ELLIOTT, M. C.; MOLONEY, M. M. Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. **Planta**, v. 146, n. 4, p. 405–408, 1979.
- POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para laranjeira pêra. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 9–14, 2014.
- POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the São Paulo. In: INT. CONG. CITROS NURSERYMEN, 6., 2001. Ribeirão Preto. Proceedings. Bebedouro: International Society of Citrus Nurserymen, 2001. p. 75 - 82.
- RAZA, W.; YOUSAF, S.; RAJER, F. U. Plant Growth Promoting Activity of Volatile Organic Compounds Produced by Biocontrol Strains. **Science Letters**, v. 4, n. 1, p. 40–43, 2016.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 305–339, 2009.

RILLIG, M. C. et al. Soil Biodiversity Effects from Field to Fork. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 1, p. 17–24, 2018.

RODRIGUES, A. A. et al. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 149–158, 2016.

RODRÍGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Bio**, v. 84, p. 155–161, 2000.

ROZANE, D. E. et al. Efeito das doses de nitrogênio, fósforo e potássio na nutrição e na produção do porta-enxerto de limoeiro cravo. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 255–260, 2009.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.

SARITA, S. et al. Diversity of nifH gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**, v. 94, n. 1, p. 109–115, 2008.

SEVILLA GUZMÁN, E. Sobre as perspectivas teórico-metodológicas da Agroecologia. **Redes - Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul**, v. 22, n. 2, p. 13–30, 2017.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2013.

SHARMA, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, R. B. Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res**, v. 1, n. 2, p. 90–95, 2011.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 311–319, 2000.

SINGH, D. et al. **Impacts of agrochemicals on soil microbiology and food quality**. [s.l.] LTD, 2020.

SINGH, V.; DEVERALL, B. J. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 83, n. 3, p. 487–490, 1984.

SIQUEIRA, J. O. et al. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. **EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 1994.

SOLANKI, M.; KUNDU, B. S.; NEHRA, K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. **Annals of**

Agrarian Science, v. 16, n. 4, p. 458–463, 2018.

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

STOVER, E. et al. Conventional citrus of some scion/ rootstock combinations show field tolerance under high huanglongbing disease pressure. **HortScience**, v. 51, n. 2, p. 127–132, 2016.

STRICKLAND, M. S.; ROUSK, J. Considering fungal: Bacterial dominance in soils - Methods, controls, and ecosystem implications. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1385–1395, 2010.

USDA, 2020. All countries production orange juice. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery> (acesso 22 novembro 2020).

VENTURA, J. A. et al. Jaboticabal-SP, v. 39, p. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, p. 173–194, 2017.

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. **Anais...**2001

VIVES-PERIS, V. et al. Root exudates from citrus plants subjected to abiotic stress conditions have a positive effect on rhizobacteria. **Journal of Plant Physiology**, v. 228, p. 208–217, 2018.

WAGI, S.; AHMED, A. *Bacillus* spp.: Potent microfactories of bacterial IAA. **PeerJ**, n. 7, 2019.

WALL, L. G. et al. Changes of paradigms in agriculture soil microbiology and new challenges in microbial ecology. **Acta Oecologica**, v. 95, n. January, p. 68–73, 2019.

WANG, Y. Y. et al. Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. **BioResources**, v. 15, n. 2, p. 2560–2578, 2020.

WEZEL, A. et al. Agroecological principles and elements and their implications for transitioning to sustainable food systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 40, n. 6, p. 13, 2020.

WU, G. A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 656–662, 2014.

WU, G. A. et al. Genomics of the origin and evolution of Citrus. **Nature**, v. 554, n. 7692, p. 311–316, 2018.

XIAO, X. et al. Interactions of plant growth-promoting rhizobacteria and soil factors in two leguminous plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 23–24, p. 8485–8497, 2017.

YOUSUF, J. et al. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from

a tropical estuary and adjacent coastal regions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 922–932, 2017.

ZAHOOR et al. Role of nitrogen fertilizer in crop productivity and environmental pollution. **International Journal of Agriculture and Forestry**, v. 4, n. 3, p. 201–206, 2014.

ZENG, Q.; WU, X.; WEN, X. Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2, and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1343–1354, 2016.

ZHANG, D. J. et al. Auxin modulates root-hair growth through its signaling pathway in citrus. **Scientia Horticulturae**, v. 236, n. December 2017, p. 73–78, 2018.

ZHOU, G. F.; PENG, S. A.; LIU, Y. Z. The physiological and nutritional responses of seven different citrus rootstock seedlings to boron deficiency. **Trees**, v. 28 p. 295–307, 2014.