



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KARLA BIANCA DE ALMEIDA LOPES

**DIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM
CULTIVARES DE SOJA CONVENCIONAIS E
TRANSGÊNICAS**

Londrina
2015

KARLA BIANCA DE ALMEIDA LOPES

**DIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM
CULTIVARES DE SOJA CONVENCIONAIS E
TRANSGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientador(a): Profa. Dra. Valéria Carpentieri
Pípolo.

Londrina
2015

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L864d Lopes, Karla Bianca de Almeida.

Diversidade bacteriana endofítica em cultivares de soja convencionais e transgênicas / Karla Bianca de Almeida Lopes. – Londrina, 2015.
81 f. : il.

Orientador: Valéria Carpentieri Pípolo.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Soja – Resistência a herbicidas – Teses. 2. Plantas transgênicas – Teses. 3. Crescimento (Plantas) – Teses. 4. Bactérias – Teses. I. Pípolo, Valéria Carpentieri. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 631.52:633.34

KARLA BIANCA DE ALMEIDA LOPES

**DIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM CULTIVARES DE
SOJA CONVENCIONAIS E TRANSGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a Valeria Carpentieri
Pipolo

Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Giuliano Degrassi
International Centre for Genetic Engineering
and Biotechnology - ICGEB

Prof. Dr. Marco Antônio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Soja- Embrapa Soja

Londrina, 03 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças pra continuar percorrendo meu caminho mesmo em meio às dificuldades.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Valéria Carpentieri Pípolo, pela contribuição ao meu conhecimento, não somente intelectual e científico, como também pessoal.

Ao Dr. Giuliano Degrassi pela orientação e apoio durante a condução do trabalho.

Aos colegas de laboratório Thiago Henrique Oro, Eduardo Stefani Pagliosa, Danielle Ferreira, Jenniffer Aparecida Schnitzer e Rodrigo Thibes Hoshino, assim como os estagiários Talita Pijus Ponce, Tamy Rodrigues Baran, Rayne Baena, Rafael Eidi Maeoka, Jackson Tavela da Silva e Osmar José Chaves Junior pela amizade e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus pais João Carlos Lopes e Albacela Alves de Almeida Lopes, e à minha irmã Geane Talia de Almeida Lopes pelo incentivo e apoio.

Às minhas amigas Izadora Rodrigues de Oliveira e Camila Gonçalves lossaqui pela amizade e apoio mesmo a distância.

Aos professores do Departamento de Agronomia de Universidade Estadual de Londrina pelos conhecimentos transmitidos.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade da realização do mestrado.

À CAPES e à Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudo.

“Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.”

C.S.Lewis

LOPES, Karla Bianca de Almeida. **Diversidade bacteriana endofítica em cultivares de soja convencionais e transgênicas**. 2015. 81 f. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade bacteriana endofítica cultivável em soja convencional e transgênica e as caracterizar fenotipicamente e genotipicamente com relação a características relacionadas à promoção do crescimento de plantas. Foram isoladas bactérias endofíticas de raízes, caules e folhas de cultivares de soja convencional e transgênica resistente a glifosato, cultivadas em três locais. Os isolados foram avaliados fenotipicamente quanto à produção de AIA, solubilização de fosfato, produção de exopolissacarídeos e sideróforos, secreção de enzimas e motilidade. Alguns isolados foram selecionados e submetidos à caracterização genotípica. Os fragmentos do gene ribossomal 16S dos isolados selecionados foram comparados e alinhados, e a relação entre os isolados foi avaliada por meio do algoritmo *neighbor-joining*. Foi verificada diferença significativa no número de UFC g⁻¹ de peso fresco entre os diferentes tecidos e cultivares, sendo que, de forma geral, os maiores números de isolados foram obtidos em raízes e em cultivares transgênicas. A análise filogenética revelou maior divergência entre as bactérias isoladas de soja transgênica do que entre os isolados obtidos de soja convencional. Alguns isolados foram detectados exclusivamente em plantas transgênicas ou convencionais, enquanto que outros foram detectados em ambas. As espécies *Pantoea agglomerans* e *Variovorax paradoxus* apresentaram uma considerável produção de AIA e solubilização de fosfato, e são candidatas potenciais para o desenvolvimento de inoculantes visando a promoção do crescimento vegetal.

Palavras-chave: Soja resistente a glifosato. Promoção do crescimento de plantas. Interação planta-bactéria. AIA. Solubilização de fosfato.

LOPES, Karla Bianca de Almeida. **Diversity of endophytic bacteria in transgenic and non-transgenic soybean**. 2015. 81 p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the diversity of endophytic bacteria in transgenic and non-transgenic soybean and characterize them phenotypically and genotypically with respect to traits related to plant growth promotion. Endophytic bacteria were isolated from roots, stems and leaves of different non-transgenic and glyphosate-resistant transgenic soybean and grown in three locations. Isolates were phenotypically evaluated regarding the production of IAA, phosphate solubilization, exopolysaccharides and siderophores, enzyme secretion and motility. Some isolates were submitted to genotypic characterization. The fragments of the 16S rDNA gene of the selected bacteria were compared and aligned, and the phylogenetic relationship was assessed by using the neighbor-joining algorithm. There was significant difference in the number of CFU g⁻¹ fresh weight between different tissues and cultivars, and, in general, the largest number of isolates were obtained from roots and transgenic cultivars. Phylogenetic analysis revealed greater divergence between the bacteria isolated from transgenic than among isolates from non-transgenic soybean. Specific bacterial species were detected exclusively in non-transgenic or transgenic plants whereas others were detected in both. *Pantoea agglomerans* and *Variovorax paradoxus* were good IAA-producers and phosphate solubilizing, and are potential candidates for the development of inoculants aiming at plant growth promotion.

Key-words: Glyphosate-resistant soybean. Plant growth promotion. Plant-bacteria interaction. IAA. Phosphate solubilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** – Densidade populacional total de bactérias endofíticas isoladas de raízes caules e folhas de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR).....46
- Figura 3.2** – Número de bactérias endofíticas isoladas de raízes, caules e folhas de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR) que produzem ácido indolacético (AIA), solubilizam fosfato (Psolub), produzem exopolissacarídeos (EPS) e sideróforos (Sidero), apresentam motilidade (Swarm+Swim) ou são imóveis (No Mot.) e que produzem protease (Prot.), lípase e quitinase (Chitin.).....47
- Figura 3.3** – Espécies de bactérias endofíticas encontradas apenas em soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR), e em ambas as cultivares (C+GR).57
- Figura 3.4** – Árvore filogenética obtida pelo método do algoritmo *neighbor-joining* construída utilizando as sequências parciais de nucleotídeos do gene 16S DNAr obtidas de bactérias endofíticas isoladas de diferentes tecidos de soja convencional. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 1.000 réplicas *bootstrap*.....58
- Figura 3.5** – Árvore filogenética obtida pelo método do algoritmo *neighbor-joining* construída utilizando as sequências parciais de nucleotídeos do gene 16S DNAr obtidas de bactérias endofíticas isoladas de diferentes tecidos de soja transgênica resistente a glifosato. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 1.000 réplicas *bootstrap*.....59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Locais, manejo e dados de coleta das cultivares convencionais e transgênicas utilizadas no trabalho40
- Tabela 3.2** – Comunidade bacteriana endofítica obtida de diferentes tecidos de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR) cultivada em diferentes locais45
- Tabela 3.3** - Análise das sequências do gene ribossomal 16S e caracterização fenotípica das bactérias endofíticas isoladas de raízes (R), caules (C) e folhas (F) de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR), cultivadas em Ponta Grossa/PR (PG), Campos Novos/SC (CN) e Guarapuava/PR (G)54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	A CULTURA DA SOJA	12
2.1.1	Importância Econômica da Soja	12
2.1.2	Soja Transgênica Roundup Ready®	13
2.2	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	15
2.3	BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	17
2.4	PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS	20
2.5	FATORES QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA NO INTERIOR DAS PLANTAS.....	22
2.6	REFERÊNCIAS.....	24
3	ARTIGO DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM SOJA TRANSGÊNICA E CONVENCIONAL	34
3.1	RESUMO E ABSTRACT.....	34
3.2	INTRODUÇÃO.....	35
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.3.1	Material Vegetal.....	38
3.3.2	Coleta das Amostras de Folhas, Raízes e Caules, e Determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)	39
3.3.3	Isolamento das Bactérias Endofíticas.....	41
3.3.4	Caracterização Fenotípica dos Isolados Bacterianos.....	41
3.3.4.1	Produção de ácido indolacético (AIA).....	41
3.3.4.2	Solubilização de fosfato.....	41
3.3.4.3	Produção de exopolissacarídeos (EPS)	42
3.3.4.4	Produção de sideróforos	42
3.3.4.5	Atividade enzimática.....	42
3.3.4.6	Motilidade: swarming e swimming	43
3.3.5	Caracterização Genotípica dos Isolados	43

3.3.6	Análise dos Dados.....	44
3.4	RESULTADOS.....	44
3.5	DISCUSSÃO.....	61
3.6	CONCLUSÕES.....	66
3.7	REFERÊNCIAS.....	67
 APÊNDICES		74
APÊNDICE A - Caracterização genotípica e fenotípica de bactérias endofíticas isoladas de raízes (R), caules (C) e folhas (F) de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR), cultivadas em Ponta Grossa/PR (PG), Campos Novos/SC (CN) e Guarapuava/PR (G).....		75
APÊNDICE B - Bactérias endofíticas isoladas de raízes de cultivares de soja A) convencionais e B) transgênicas, obtidas do ensaio no município de Guarapuava/PR.....		79
APÊNDICE C - Caracterização fenotípica de bactérias endofíticas isoladas de soja convencional e transgênica quanto a A) produção de AIA, B) produção de sideróforos, C) produção de EPS, D) solubilização de fosfato inorgânico, E) produção de protease		80
APÊNDICE D - Teste de motilidade de bactérias endofíticas isoladas de soja convencional e transgênica quanto a habilidade de A) swarming e B) swimming		81

1 INTRODUÇÃO

A soja é utilizada tanto na alimentação animal quanto humana devido a seu alto teor de proteínas, nutrientes, minerais e fibras. Algumas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a produtividade e sustentabilidade da cultura, como é a inoculação de bactérias promotoras do crescimento. O microrganismo mais utilizado na soja atualmente é o *Bradyrhizobium* sp., que fixa o nitrogênio do ar e o disponibiliza para a planta.

Outro exemplo de bactérias promotoras do crescimento que vêm sendo estudadas, são as bactérias endofíticas. Bactérias endofíticas são bactérias que habitam o interior da planta sem causar prejuízo ao hospedeiro, sendo que algumas delas podem promover o crescimento da planta.

A promoção do crescimento realizada por bactérias endofíticas pode ser devido a efeitos diretos como a produção de fitormônios, tais quais auxina, giberelina e citocinina; fornecimento de N e solubilização do fosfatos; como por efeitos indiretos por meio da promoção do antagonismo contra fitopatógenos e disponibilização de ferro para a planta.

Existem diversos fatores que podem afetar a comunidade bacteriana endofítica nas plantas, entre eles estão o genótipo, o tecido onde o endófito se encontra, o estado de desenvolvimento da planta, fatores ambientais, como variações na temperatura e na umidade, o manejo e a aplicação de agroquímicos.

Estudos mostram que a aplicação do herbicida glifosato gera uma mudança na comunidade microbiana, sendo que este pode ser tóxico para alguns microrganismos e, para outros, ser utilizado como fonte de energia e nutrientes; assim como também existem vários estudos que indicam a influência da transgenia na comunidade bacteriana presente em plantas.

Desta forma, os objetivos do trabalho foram avaliar a bacteriana endofítica em soja convencional e transgênica e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente estas bactérias com relação a características relacionadas à promoção do crescimento de plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DA SOJA

2.1.1 Importância Econômica da Soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das principais commodities mundiais, juntamente com o arroz, trigo, cevada e milho. Por séculos chineses, japoneses e coreanos a tem utilizado em sua alimentação devido a seu alto teor de proteína e abundância em vitaminas, minerais e fibras (LIU; PAN, 2011). Os principais componentes dos grãos de soja são proteína e óleo, sendo que o grão contém cerca de 40% de proteína e 20% de óleo com base na matéria seca (MORAES et al., 2006)

Por ser considerada como um grão de alta versatilidade, a soja é destinada ao processamento, originando vários produtos e subprodutos da agroindústria. Um dos produtos mais conhecidos que derivam dessa leguminosa é o óleo refinado, obtido pelo processo de esmagamento de grãos, e o farelo utilizado na alimentação animal (SIMAS, 2005; EMBRAPA, 2007; PRIMOMO et al, 2002; LEITE et al., 2012).

A soja, além de ser um componente essencial na fabricação de rações, atualmente está adquirindo uma importância crescente na produção de biodiesel. As projeções de consumo indicam que deve haver um grande aumento da demanda no mercado internacional e no mercado interno. Neste mercado, espera-se forte aumento do consumo do grão para a produção de biodiesel, estimada em 2013 pela Abiove em cerca de 10 milhões de toneladas. Para 2014, a projeção para a produção nacional deve situar-se entre 80,2 e 88,8 milhões de toneladas. As projeções da Abiove vêm indicando para 2020 uma produção entre 104,0 e 105,0 milhões de toneladas, sendo que a área de produção deve aumentar cerca de 6,7 milhões de hectares, chegando a 2023 com 34,4 milhões de hectares, representando um acréscimo de 24,3% sobre a área de 2013 (MAPA, 2012).

Em vista de sua grande importância no consumo, tanto animal como humano, muitos estudos têm sido realizados com a cultura visando aumentar sua produtividade. Uma alternativa amplamente abordada na literatura é o uso do

Bradyrhizobium para a fixação de nitrogênio (MARGARET et al., 2011; BREAR; DAY; SMITH, 2013; SÁNCHEZ-PARDO; ZORZONA, 2014).

A inoculação de leguminosas com cepas de *Bradyrhizobium* tem sido muito reconhecida, especialmente em áreas onde a nodulação natural é inadequada. Os benefícios do uso destes inoculantes mostram que é possível economizar recursos naturais e financeiros. A capacidade de fixar nitrogênio é um dos mais importantes critérios de seleção para variedades superiores de leguminosas porque a fixação de N é uma demanda básica para uma alta produção (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; FATIMA; ZIA; CHAUDHARY, 2007).

Outra metodologia abordada visando o aumento da produção da cultura é a utilização de bactérias que promovem o crescimento da planta pela síntese de fitormônios, moléculas que complexam ferro, dentre outros mecanismos. Vários trabalhos estão sendo realizados com o objetivo de identificar possíveis candidatos à inoculação em soja (HUNG; ANNAPURNA, 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; ASSUMPÇÃO et al., 2009).

2.1.2 Soja Transgênica Roundup Ready®

A soja geneticamente modificada foi lançada no mercado americano na década de 90; a cultura rapidamente ganhou espaço nos Estados Unidos e, posteriormente, na Argentina, os quais são os maiores produtores mundiais de soja geneticamente modificada. Por estar presente em área de fronteira com o Brasil, a tecnologia não tardou a ser incorporada pelos produtores brasileiros, motivados pelas facilidades de manejo (ABRAHÃO, 2008).

Um recorde de 175,2 milhões de hectares de culturas transgênicas foram cultivados no mundo no ano de 2013, a uma taxa de crescimento anual de 3% (ISAAA, 2013). Segundo dados do ISAAA (2013), o Brasil ocupa o segundo lugar em área plantada de organismos geneticamente modificados no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos e está emergindo como um forte líder global em culturas biotecnológicas. Em 2013, foi cultivada a primeira soja com empilhamento de genes com tolerância a herbicidas e resistência a insetos, em uma área de 2,2 milhões de hectares.

A soja transgênica Roundup Ready® foi desenvolvida pela Companhia Monsanto (St. Louis, MO, EUA) nos anos de 1980 com o objetivo de se

disponibilizar um material tolerante a herbicidas cuja base fosse o glifosato, principalmente para a utilização em sistemas de semeadura direta (ABRAHÃO, 2008). O glifosato (N-fosfometil glicina) é um herbicida sistêmico, com largo espectro de ação, recomendado para o controle em pós-emergência de uma ampla gama de plantas, não seletivo na sua ação sobre mono ou dicotiledôneas, uma vez que inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase – EPSPS, envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos, provocando atraso no desenvolvimento, desbalanço de aminoácidos e conseqüente morte das plantas (YAMADA; CASTRO, 2007).

O lançamento da soja transgênica, tolerante ao herbicida Roundup Ready® (RR) revolucionou o mercado de soja mundial. No Brasil, a história da soja transgênica começou em 1995. Nesse ano, por meio da Lei de Biossegurança, o cultivo de plantas de soja RR foi autorizado no país em caráter experimental. No entanto, cultivares de soja da Argentina, contrabandeadas, passaram nesta época a serem cultivadas ilegalmente no Sul do Brasil, tornando-se rapidamente grande parte da área plantada com soja nesta região. Mediante a safra de soja ilegal, em 1998, a CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) autorizou o cultivo da soja RR (GRIS, 2009).

A utilização da soja RR proporcionou diversos benefícios ao agricultor, dentre eles a diminuição do uso de herbicidas mais tóxicos em termos de ação do que o glifosato, além da facilidade do manejo. De acordo com Abrahão (2008), o glifosato deixa menos resíduo no solo quando comparado aos outros princípios ativos utilizados para controle de plantas de folha larga e estreita, representando uma opção de menor impacto sobre o solo, a água e as culturas subsequentes da área.

Apesar das vantagens, o uso do glifosato tem alguns impactos sobre a soja e também sobre a biota do solo. Alguns efeitos, descritos na literatura, causados pela aplicação de glifosato na cultura são a redução do crescimento inicial da parte aérea, redução da nodulação (para aplicações precoces) e, conseqüentemente, redução do sistema radicular (NORSWORTHY; FREDERICK, 2002). De acordo com Richetti (2013), em termos de eficiência, a soja convencional tem ligeira vantagem sobre a soja transgênica na maioria das condições de favorabilidade, tanto nas variações de preços, quanto de quantidades produzidas.

Dallmann et al. (2010) verificaram que a utilização de herbicida e soja geneticamente modificada reduziu a microbiota fúngica do solo e não alterou significativamente a contagem bacteriana. Todavia Arantes, Lovorenti e Tornisielo (2007), avaliando dois tipos de solo (Neossolo quartzarênico e Latossolo vermelho) constataram que o glifosato reduziu a atividade microbiana, independente do uso ou não de calagem. Resultado semelhante foi encontrado por Andréa et al. (2003), em que a biomineralização do glifosato diminuiu com o aumento de aplicações, indicando efeito do herbicida sobre a atividade microbiológica do solo. Em estudos realizados com fungos e bactérias do solo, Busse et al. (2001) verificaram que ocorreu efeito tóxico no crescimento populacional e na diversidade metabólica pelo uso contínuo (9 – 13 anos) do herbicida glifosato na mesma área.

A ação dos microrganismos sobre substâncias xenobióticas presentes no ambiente constitui-se mecanismo de suma importância, sendo reconhecida como o principal fator que determina a taxa e a extensão em que são degradados (BEIGEL; CHANNAY, 1999).

2.2 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

As plantas possuem um microecossistema complexo que abriga uma diversificada gama de bactérias capazes de colonizar seus diferentes órgãos e tecidos, como raízes, folhas, flores, frutos e sementes (HALLMANN et al., 1997; GRAY; SMITH, 2005), e que podem causar efeitos diversos no hospedeiro (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). A interação planta-bactéria pode se dar de quatro formas: como um patógeno, como um simbiote, como uma epífita ou como uma endofítica (INIGUEZ et al., 2005).

Bactérias fitopatogênicas são patógenos de plantas que provocam lesões em seu hospedeiro e possuem um difícil controle (ROMEIRO, 1976). Para que a doença ocorra, é necessário que ocorra uma interação entre o patógeno, o hospedeiro e o ambiente, onde a planta deve ser susceptível e o ambiente favorável para que aconteça a infecção (ROMEIRO, 1976; AGRIOS, 1978; MONTESINOS et al., 2002). Normalmente, os fitopatógenos colonizam o apoplasto de plantas e, deste local, fora das paredes das células, provocam uma variedade de doenças em diversas plantas cultivadas (ALFANO; COLLMER, 1996). Neste tipo de interação, apenas a bactéria é beneficiada.

Na simbiose, tanto a bactéria quanto o hospedeiro são beneficiados. Neste tipo de interação há uma ajuda mútua entre os organismos, sendo que o fluxo de nutrientes não é exclusivamente requerido. Qualquer efeito protetor entre organismos, que aumente a capacidade de sobrevivência ou reprodução, é suficiente para que se configure a simbiose (SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004). Um exemplo deste tipo de interação que tem grande relevância na área agrônômica é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), onde o microrganismo transforma o N atmosférico em amônia e esta é assimilada pelas plantas, enquanto que a bactéria absorve os assimilados do hospedeiro, sem prejudicar seu desenvolvimento (MITHÖFER, 2002).

O termo epífita etimologicamente refere-se a habitantes da superfície de plantas (do Grego *epi*: sobre e *phyton*: planta). No entanto, seu uso é geralmente limitado à parte aérea do hospedeiro (JACQUES; MORRIS, 1995). Apesar de o termo dar a entender que são microrganismos localizados, pelo menos primariamente, na superfície de plantas, algumas bactérias podem estabelecer populações internas atuando como patógenos (BEATTIE; LINDOW, 1999).

Bactérias endofíticas são definidas como aquelas que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior de um vegetal (AZEVEDO et al., 2000), e que podem contribuir para a saúde e o crescimento de seu hospedeiro, sem causar efeitos negativos sobre o seu desenvolvimento (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; SHENPAGAM et al., 2012). Hallmann et al. (1997) sugerem que evolutivamente as bactérias endofíticas são intermediárias entre as bactérias saprófitas e patogênicas, além de especularem a possibilidade de as bactérias endofíticas serem mais evoluídas que as patogênicas por se nutrirem do hospedeiro sem matá-lo.

De acordo com Azevedo et al. (2000), a diferença entre endofíticas, epífitas e fitopatógenos tem um significado puramente didático; existe um gradiente de separação entre eles, desta forma é complexo traçar um limite de forma a discriminar cada categoria. Conclui-se que o conceito de bactérias endofíticas não mais se refere à localização e sim à função que esses microrganismos exercem no ecossistema, estando em constante modificação, por depender de informações sobre a associação endófito-bactéria que ainda não estão completamente compreendidas (BORGES, 2006).

2.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

O sistema radicular da planta, além de ser o responsável pela sua sustentação e absorção de água e nutrientes, regula numerosas interações com microrganismos benéficos como rizóbios, fungos micorrízicos, bactérias endofíticas, rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR - *Plant-Growth Promoting Rhizobacteria*); e interações com parasitas e com microrganismos patogênicos que habitam o solo. As plantas constituem um vasto e diverso nicho para organismos endofíticos sendo que não há uma única espécie de planta desprovida de endófitos (DUDEJA et al., 2012).

Bactérias endofíticas podem ser definidas como bactérias associadas a plantas que habitam a parte interna dos tecidos (AZEVEDO et al., 2000; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; SHENPAGAM et al., 2012). A colonização de bactérias endofíticas pode ser local, em um tecido específico da planta, como o córtex, ou pode ser sistêmica, sendo transportada pelos elementos condutores ou via apoplastos (JAMES et al., 1994). A colonização é preferencialmente intercelular, com apenas poucos relatos de colonização intracelular (HALLMANN et al., 1997).

A capacidade das bactérias em colonizar tecidos internos de plantas pode conferir uma vantagem ecológica sobre as que somente conseguem colonizar a planta epifitamente. Acredita-se que os tecidos internos das plantas provêm um ambiente mais uniforme e protegido para os microrganismos do que a superfície, onde estes estão expostos aos estresses ambientais tais como temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta, e competição entre microrganismos, que são fatores limitantes para a sobrevivência da bactéria (HALLMANN et al., 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998). Entretanto, provavelmente existem outros fatores limitantes que podem sobressair durante o estabelecimento das populações nos tecidos internos das plantas. Assim, o estabelecimento e manutenção da população bacteriana poderiam ser limitados e influenciados pelos mesmos fatores que afetam a saúde da planta (HALLMANN et al., 1997).

Pesquisas indicam que as bactérias endofíticas não estão sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorre na rizosfera, e têm maior eficiência do que bactérias colonizadoras da rizosfera na promoção do crescimento, absorção de água e na supressão de microrganismos deletérios, em razão de se encontrarem no interior do sistema radicular (AMORIM; MELO, 2002; SANTOS et

al., 2005). Atualmente, não é claro se as plantas se beneficiam das bactérias endofíticas ou das rizobactérias, ou se é mais vantajoso para uma bactéria se tornar endofítica quando comparada com uma rizobactéria. Ambas podem promover o crescimento da planta, ou trabalhar em conjunto; mas os benefícios conferidos às endofíticas são bem conhecidos (DUDEJA et al., 2012).

Desde os primeiros trabalhos sobre o isolamento de bactérias endofíticas de plantas (MUNDT; HINKLE, 1976), mais de 200 gêneros de bactérias de 16 filos tem sido reportados como endofíticas, como as pertencentes aos filos *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* e *Verrucomicrobiae*, que incluem tanto bactérias cultiváveis como não cultiváveis (BERG; HALLMANN, 2006; MENGONI et al., 2009; MANTER et al., 2010; SESSITSCH et al., 2012). Entretanto, as endofíticas mais estudadas e de maior predominância pertencem aos três maiores filos (*Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*) e incluem os membros do filo *Azoarcus* (KRAUSE et al., 2007), *Acetobacter* (renomeadas como *Gluconobacter*) (BERTALAN et al., 2009), *Bacillus* (DENG et al., 2011), *Enterobacter* (TAGHAVI et al., 2010), *Burkholderia* (WEILHARTER et al., 2011), *Herbaspirillum* (PEDROSA et al., 2011), *Pseudomonas* (TAGHAVI et al., 2009), *Serratia* (TAGHAVI et al., 2009), and *Streptomyces* (SUZUKI et al., 2005). Espécies destes gêneros são ubíquas no solo/rizosfera, que representam a principal fonte dos colonizadores endofíticos (HALLMANN; BERG, 2006). Outro possível sítio de recuperação de endofíticas inclui a filosfera e as sementes (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). A ocorrência de bactérias endofíticas pode ser visualizada por FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) com microscopia confocal com escaneamento a laser usando sondas específicas (AMANN et al., 1990; LOY et al., 2007).

Um fator de extrema importância e limitante nas investigações de bactérias endofíticas é a metodologia de isolamento. O procedimento de isolamento das bactérias endofíticas envolve cuidados especiais e é de fundamental importância para o enquadramento do organismo como um endofítico. Teoricamente, qualquer procedimento que elimina a microbiota epifítica e retrata as populações internas de forma completa deve ser considerado. Como o caráter endofítico é atribuído às bactérias isoladas, exclusivamente, a partir de tecidos

vegetais sadios superficialmente esterilizados, os processos de desinfestação superficial são definitivos para manter o conceito e delimitar o habitat endofítico. Entretanto, erros podem advir como resultado de uma desinfestação incompleta da superfície, da adsorção de células bacterianas por estruturas celulares das plantas ou da penetração do agente esterilizante, no interior dos tecidos da planta, resultando na perda de endofíticas (HALLMANN et al., 1997).

Exemplos de aplicações biotecnológicas de bactérias endofíticas descritas na literatura abrangem a sua utilização na produção de antibióticos e outras moléculas bioativas, relacionados aos efeitos antagônicos da microbiota benéfica contra microrganismos patogênicos (STURZ; CHRISTIES; NOWAK, 2000), em processos de biorremediação (LODEWYCKX et al., 2002) e na promoção do crescimento de plantas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

De acordo com Kuklinsky-Sobral (2003), a utilização de bactérias endofíticas na produção agrícola depende do conhecimento sobre os mecanismos de interação planta-bactéria e da habilidade de manter, manipular e modificar populações benéficas sob condições de campo.

Na literatura existem diversos trabalhos envolvendo isolamento, caracterização, sequenciamento genômico, antagonismo a fungos e bactérias patogênicos, e promoção do crescimento de plantas promovido por bactérias endofíticas em diversas culturas como arroz, batata, feijão, girassol, helicônia, pimenta, plantas medicinais, entre outras (STURZ et al., 1997; SANTOS et al., 2005; BERG; HALLMANN, 2006; KANG et al., 2007; KRAUSE et al., 2007; SUN et al., 2008; BERTALAN et al., 2009; TAGHAVI et al., 2009; MANTER et al., 2010; BHORE; SATHISHA, 2010; TAGHAVI et al., 2010; DENG et al., 2011; PEDROSA et al., 2011; ZHAO et al., 2011; WEILHARTER et al., 2011; COSTA et al., 2012; GOES et al., 2012; SHENPAGAM et al., 2012; DING; PALMER; MELCHER, 2013; SINGH; MALIK; SINGH, 2013).

Todavia, em soja o número de trabalhos não é tão expressivo e, de maneira geral, envolvem isolamento, caracterização, promoção do crescimento em plantas, estudo do dinamismo populacional bacteriano e antagonismo a fungos (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2003; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; HUNG; ANNAPURNA, 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; HUNG et al., 2007; ASSUMPÇÃO et al., 2009; SENTHILKUMAR et al., 2009; DALAL; KULKARNI, 2013). Além disso, pouco se sabe sobre as interações planta-bactéria e sobre os

benefícios que as bactérias podem propiciar à planta de forma que possam ser utilizadas como inoculantes no campo (HUNG; ANNAPURNA, 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; HUNG et al., 2007; KANG et al., 2007; ASSUMPÇÃO et al., 2009; ANDREOTE et al., 2010).

2.4 PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Bactérias promotoras do crescimento das plantas (PGPB – *Plant Growth Promoting Bacteria*) incluem microrganismos de vida livre, que tem um relacionamento simbiótico com as plantas (ex., *Rhizobium* spp. e *Frankia* spp.), bactérias endofíticas, que podem colonizar parcialmente ou completamente o interior de um tecido vegetal, e cianobactérias. Contudo, apesar de existirem diferenças entre estas bactérias, elas utilizam os mesmos mecanismos (GLICK, 1995).

Algumas bactérias endofíticas têm vários efeitos benéficos no crescimento e desenvolvimento do hospedeiro. O estímulo do crescimento de plantas promovido por estas bactérias é resultado de efeitos indiretos, como antagonismo contra patógenos e competição por ferro (KANG et al., 2007; GOES et al., 2012), e de efeitos diretos, tais quais a produção de fitormônios, fornecimento de nitrogênio e solubilização do fósforo do solo (BASHAN, 1998; VESSEY, 2003; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; KANG et al., 2007).

Bactérias que produzem sideróforos podem atuar de forma benéfica ao hospedeiro; estes microrganismos secretam sideróforos quando estão em ambientes com baixa disponibilidade de Fe e estes atuam como promotores do crescimento vegetal por disponibilizar o Fe à planta em forma de complexo sideróforo-Fe⁺³ e por imobilizar o ferro disponível para a proliferação de fitopatógenos (VESSEY, 2003).

Outro mineral importante para o desenvolvimento de plantas é o fósforo. A absorção de fósforo pelas plantas é complicada, pois este é presente no solo em formas insolúveis e não disponíveis para a absorção. Bactérias que habitam a rizosfera de plantas que secretam ácidos orgânicos e fosfatases que possibilitam que esse nutriente se torne disponível para o hospedeiro (KIM; JORDAN; McDONALD, 1998). Algumas espécies de bactérias que são capazes de solubilizar compostos fosfatados orgânicos são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* e *Burkholderia* (VESSEY, 2003).

Tem-se observado que muitas PGPB podem secretar hormônios de plantas, como auxinas, giberelinas e citocininas. Estes hormônios têm sido implicados na promoção do crescimento de plantas por bactérias uma vez que os efeitos da inoculação de bactérias na arquitetura de raízes (como o incremento no volume de raízes e no número de raízes laterais) são similares aos efeitos da aplicação exógena de uma solução contendo estes hormônios (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979).

Apesar dos efeitos benéficos descritos, bactérias endofíticas promotoras do crescimento geralmente não têm efeitos previsíveis para o crescimento e desenvolvimento de todos os hospedeiros, embora os mecanismos implícitos possam ser semelhantes (DUDEJA et al., 2012).

Algumas pesquisas têm sido direcionadas a fim de encontrar bactérias endofíticas que possam aumentar a produtividade de diferentes culturas quando inoculadas. Para revelar o efeito dessas bactérias, experimentos com inoculação têm sido realizados, todavia, tem sido um problema eliminar endófitos residentes ou nativos de modo a ter plantas ou sementes livres de bactérias. A redundância funcional de endofíticas residentes e adicionadas via inoculação pode limitar os efeitos observados com a inoculação. Interações complexas entre comunidades microbianas e plantas, uma rizosfera pobre de organismos endógenos (STURZ; CHRISTIES; NOWAK, 2000), e flutuações bacterianas devido às condições ambientais podem ser fatores limitantes na aplicabilidade da inoculação de bactérias endofíticas a campo (STURZ; NOWAK, 2000). Além disso, a campo, a ampla abundância e diversidade de bactérias do solo podem ser uma rica fonte de bactérias endofíticas e, por isso, os efeitos da inoculação podem não ser observados (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Inoculantes têm se mostrado bem sucedidos na micropropagação de plantas, uma vez que existam poucos ou nenhum outro microrganismo com os quais competir. Nestes casos, quando as plântulas são inoculadas, estas são mais vigorosas e têm maior resistência à seca, a patógenos, sofrem menores danos devido ao transplante e apresentam mortalidade reduzida (SAHAY; VARMA, 1999; BARKA et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2003).

Existem poucos produtos à base de bactérias promotoras de crescimento recomendados para plantas não leguminosas e, os que vêm sendo utilizados, normalmente pertencem ao gênero *Azospirillum* (OKON; ITZIGSOHN,

1995). A baixa difusão do uso de inoculantes pode ser devido à baixa reprodutibilidade dos resultados por causa das condições edafo-climáticas, interações com a biota do solo, influência do veículo inoculante e forma de aplicação e à escassez de programas de seleção de estirpes (BUCHER; REIS, 2008).

Em leguminosas, mais especificamente em soja, já são comercializados inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que promovem o crescimento do hospedeiro pela fixação do N do ar e posterior disponibilização do nutriente para a planta (MARGARET et al., 2011; BREAR; DAY; SMITH, 2013; SÁNCHEZ-PARDO; ZORZONA, 2014).

2.5 FATORES QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA NO INTERIOR DAS PLANTAS

As comunidades bacterianas são, em sua maioria, bastante complexas e sensíveis a alterações ambientais; sabe-se que estas apresentam uma alta capacidade reprodutiva, com ciclos vitais muito curtos, levando a uma alta capacidade adaptativa, com rápida alteração no perfil destas comunidades de acordo com alterações ambientais (ABBY; DAUBIN, 2007).

Existem diversos fatores que podem afetar a população de bactérias no interior das plantas, entre eles estão espécie, tecido ou estágio de desenvolvimento do hospedeiro, alterações no metabolismo da planta, aplicações de substâncias químicas, como herbicidas, e interações com outros microrganismos (ANDREOTE et al., 2010; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; ZINNIEL et al., 2002).

O genótipo da planta pode ter influência direta na associação planta-bactéria, pois este pode alterar os exsudados liberados pelas raízes e disponibilizados aos grupos bacterianos, afetando a colonização por rizobactérias, assim como os níveis de proteínas presentes na planta (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000; GARCÍA-VILLALBA et al., 2008; BRANDÃO; BARBOSA; ARRUDA, 2010; BARBOSA et al., 2012).

Andreote (2007) comparando a composição da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplano entre duas cultivares de eucalipto convencionais e quatro transgênicas, verificaram a diminuição da população de *Methylobacterium* spp., bactéria de grande importância em interação com plantas,

em apenas uma das cultivares transgênicas avaliadas. O autor atribuiu o resultado observado ao fato de que o local onde este gene foi inserido para obtenção da planta pode ter interferido na atividade de outros genes. Acredita-se que o cultivo de plantas geneticamente modificadas possa gerar mudanças na atividade microbiana devido às diferenças na quantidade e composição dos exsudados liberados pelas raízes ou devido às alterações de práticas de cultivo para estas culturas (MOTAVALLI et al., 2004).

O estágio de desenvolvimento do hospedeiro também pode influenciar a população de bactérias. Dalal e Kulkarni (2013), estudando bactérias endofíticas associadas à soja, verificaram que a população bacteriana aumentou com o desenvolvimento da planta, sendo que esta começou a diminuir no início do estágio reprodutivo.

Além da influência causada pelo genótipo e estágio de desenvolvimento, bactérias associadas a plantas sofrem grande influência do ambiente. Mocali et al. (2003), estudando bactérias endofíticas isoladas de olmos, verificaram que a população bacteriana foi influenciada por variações na temperatura (calor ou frio, dependendo da estação em que as amostras foram coletadas) e pelo tecido observado (raízes ou caules). Já Dalmastrri et al. (1999) observaram que o solo foi o principal fator na variação da população de *Burkholderia cepacia* associadas a raízes de milho.

A inoculação de outros microrganismos também afeta a comunidade bacteriana. No solo, os grupos bacterianos estão em associação e equilíbrio. Desta forma a inoculação de bactérias pode gerar uma modificação deste ambiente e conseqüente alteração da comunidade bacteriana (ANDREOTE et al., 2004). Andreote et al. (2006) mostraram que a inoculação de *Methylobacterium mesophilicum* causou mudanças na população de bactérias endofíticas da raiz e do caule, verificadas por meio da alteração nos perfis de PCR-DGGE para os grupos das α e β -proteobactérias.

O manejo da cultura é um fator de extrema importância e de grande impacto na comunidade microbiana, principalmente devido à aplicação de agroquímicos. Rosseto (2008), analisando a densidade de bactérias em plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas, verificou que o manejo, independentemente da cultivar, pode influenciar a comunidade bacteriana; o autor

observou redução na densidade de bactérias associada à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar transgênicas e tratadas com o herbicida Imazapyr.

Outro químico amplamente utilizado na agricultura, principalmente após o lançamento das cultivares transgênicas no mercado, é o glifosato. A adição deste herbicida pode gerar modificação na composição de bactérias endofíticas associadas à plantas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005), sendo que este químico pode ser letal para alguns microrganismos (BUSSE et al., 2001), todavia pode servir como fonte de nutrientes e energia para outros.

Sabe-se que a utilização do glifosato pode alterar a comunidade microbiana endofítica (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005), todavia são necessários mais estudos para confirmar se essas alterações têm efeitos benéficos ou não para a planta e quais são as implicações destas mudanças para o ambiente.

2.6 REFERÊNCIAS

ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and evolution of prokaryotes. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 135-141, 2007.

ABRAHÃO, O.S. **Rastreabilidade de soja Roundup Ready em produtos agrícolas e derivados: produtos de materiais de referência e uso de marcadores AFLP**. 2008. 85 f. Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e Ambiente) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 2. ed. Florida: Academic Press, 1978. 703p.

ALFANO J.R., COLLMER A: Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. **Plant Cell**, v. 8, p. 1683-1698, 1996.

ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and soil**, v. 252, p. 1-9, 2003.

AMANN, R.L.; BINDER, B.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 6, p. 1919-1925, 1990.

AMORIM, E.P.R.; MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.

ANDRÉA, M. M.; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L. T. Influence of repeated applications of glyphosate

in its persistence and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1329-1335, 2003.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **J. Microbiol.**, v. 42, p. 169-173, 2004.

ANDREOTE, F.D.; LACAVAL, P.T.; GAI, C.S.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 419-426, 2006.

ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; VAN OVERBEEK, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389–399, 2010.

ARANTES, S. A. C. M.; LOVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L. Efeito da calagem e do glyphosate na atividade microbiana de diferentes classes de solos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 19-28, 2007.

ASSUMPÇÃO, L.C.; LACAVAL, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BARBOSA, H.S.; ARRUDA, S.C.C.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A.Z. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 299–314, 2012.

BARKA, E.A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J.; AUDRAN, J.C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 186, p. 91-95, 2000.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotech. Adv.**, v. 16, p. 729-770, 1998.

BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial Colonization of Leaves: A Spectrum of Strategies. **The American Phytopathological Society**, v. 89, n. 5, p. 353-359, 1999.

BEIGEL, C.; CHANNAY, M.P. Degradation of formulated and unformulated fungicide in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 59-65, 1999.

BERG, G.; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T.N. **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer, 2006. p. 53–67.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PÁDUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K. et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, n. 450, p. 1-17, 2009.

BHORE, S.J.; SATHISHA, G. Screening of Endophytic Colonizing Bacteria for Cytokinin--Like Compounds: Crude Cell--Free Broth of Endophytic Colonizing Bacteria Is Unsuitable in Cucumber Cotyledon Bioassay. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2010.

BORGES, L.E. **Caracterização estrutural da associação epifítica e endofítica entre microrganismos e plantas em um ambiente agrícola tropical**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.

BRANDÃO, A.R.; BARBOSA, H.S.; ARRUDA, M.A.Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 1433-1440, 2010.

BREAR, E.M.; DAY, D.A.; SMITH, P.M.C. Iron: an essential micronutrient for the legume–rhizobium symbiosis. **Front. Plant. Sci.**, v. 4, p. 1-15, 2013.

BUCHER, C.A.; REIS, V.M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2008. 17 p. EMBRAPA Agrobiologia. Documentos 247.

BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1777-1789, 2001.

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 Biol. Biochem.**, v. 42, p. 669-678, 2010.

COSTA, L.E.O.; QUEIROZ, M.V.; BORGES, A.C.; MORAES, C.A.; ARAÚJO, E.F. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*PHASEOLUS VULGARIS*). **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1562-1575, 2012.

DALAL, J.; KULKARNI, N. Population dynamics and diversity of endophytic bacteria associated with soybean. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 96-105, 2013.

DALLMANN, C.M.; SCHENEIDER, L.; BOHM, G.M.B.; KUHN, C.R. Impacto da aplicação de glifosato na microbiota do solo cultivado com soja geneticamente modificada. **Revista Thema**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2010.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microb. Ecol.**, v. 38, p. 273–284, 1999.

DENG, Y.; ZHU, Y.; WANG, P.; ZHU, L.; ZHENG, J.; LI, R.; RUAN, L.; PENG, D.; SUN, M. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity for the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.*, v. 193, n. 8, p. 2070-2071, 2011.

DING, T.; PALMER, M.W.; MELCHER, U. Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. **BMC Microbiology**, v. 13, v. 1, p. 1-11, 2013.

DUDEJA, S.S.; GIRI, R.; SAINI, R.; SUNEJA-MADAN, P.; KOTHE, E. Review: Interaction of endophytic microbes with legumes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 248–260, 2012.

EMBRAPA, 2007. **Soja: Diferentes usos dos grãos**. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/index.php?op_page=25&cod_pai=29. Acesso em 22 jul. 2013.

FATIMA, Z.; ZIA, M.; CHAUDHARY, M.F. Interactive effect of Rhizobium strains and P on soybean yield, nitrogen fixation and soil fertility. **Pak. J. Bot.**, v. 39, n. 1, p. 255-264, 2007.

GARCÍA-VILLALBA, R.; LEÓN, C.; DINELLI, G.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GARCIA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A. Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 164–173, 2008.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109–117, 1995.

GOES, K.C.G.P.; FISHER, M.L.C.; CATTELAN, A.J.; NOGUEIRA, M.A.; CARVALHO, C.G.P.C.; OLIVEIRA, A.L.M. biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, n. 4, p. 437–447, 2012.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biol. Biochem.**, v. 37, p. 395–412, 2005.

GRIS, C.F. Qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e RR associada ao conteúdo de lignina. 2009. 134 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2009.

HALLMANN J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, WF.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 895–914, 1997.

HALLMANN, J.; BERG, G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T. **Microbial root endophytes**. eds. Berlin: Springer, 2006. p. 15–31.

HUNG, P.Q.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). **Omonrice**, v. 12, p. 92-101, 2004.

HUNG, P.Q.; KUMAR, S.M.; GOVINDSAMY, V.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **BiolFertil Soils**, v. 44, p. 155–162, 2007.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; CARTER, H.D.; AHMER, B.M.M.; STONE, J.M.; TRIPLETT, E.W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **MPMI**, v. 18, n. 2, p. 169-178, 2005.

ISAAA. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**: 2013. Disponível em: <<http://isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/default.asp>>. Acesso em: 14 maio 2014.

JACQUES, M.; MORRIS, C.E. A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 18, p. 1-14, 1995.

JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINNER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 757-766, 1994.

KANG, S.H.; HYUN-SOO, C.; HOON, C.; CHOONG-MIN, R.; JIHYUN, F.K.; SEUNG-HWAN, P. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 96-103, 2007.

KIM, K.Y., JORDAN, D., McDONALD, G.A. Effects of phosphate solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 79–87, 1998.

KOZDROJ, J.; VAN ELSAS; J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p 1405-1417, 2000.

KRAUSE, A.; RAMAKUMAR, A.; BARTELS D.; BATTISTONI F.; BEKEL T.; BOCH J.; BÖHM M.; FRIEDRICH, F.; HUREK, T.; KRAUSE, L.; LINKE, B.; MCHARDY, A.C.; SARKAR, A.; SCHNEIKER, S.; SYED, A.A.; THAUER, R.; VORHÖLTER, F.-J.; WEIDNER, S.; PÜHLER, A.; REINHOLD-HUREK, B.; KAISER, O.; GOESMANN, A. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Nature Biotech.**, v. 24, p. 1385-1391, 2007.

- KUKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine Max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174 f. Tese (Doutorado em Agronomia), - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–125, 2004.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v. 273, p. 91–99, 2005.
- LEITE, P.R.S.C.; MENDES, F.R.; PEREIRA, M.L.R.; LACERDA, M.J.R. Limitações da utilização da soja integral e farelo de soja na nutrição de frangos de corte. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1138-1157, 2012.
- LIU, C.F.; PAN, T.M. Beneficial Effects of bioactive peptides derived from soybean on human health and their production by genetic engineering. In: EL-SHEMY, H. **Soybean and health**. China: Intech, 2011. p. 311-328.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.
- LOY, A.; MAIXNER, F.; WAGNER, M.; HORN, M. probeBase-an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. D800-D804, 2007.
- MANTER, D.K.; DELGADO, J.; HOLM, D.G.; STONG, R. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. **Microb. Ecol.**, v. 60, p. 157-166, 2010.
- MARGARET, I.; BECKER, A.; BLOM, J.; BONILLA, I.; GOESMANN, A.; GÖTTFERT, M.; LLORET, J.; MITTARD-RUNTE, V.; RÜCKERT, C.; RUIZ-SAINZ, J.E.; VINARDELL, J.M.; WEIDNER, S. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 1, p.11–19, 2011.
- MARTÍNEZ, L.; CABALLERO, J.; OROZCO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa spp.*). **Plant Soil**, v. 257, p. 35-47, 2003.
- MENGONI, A.; PINI, F.; HUANG, L-N; SHU, W-S; BAZZICALUPO, M. Plant-by-plant variations of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* Desv. **Microb. Ecol.**, v. 58, p. 660-667, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA, 2012. **Brasil projeções do agronegócio 2012/2013 a 2022/2023**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20-%20versao%20atualizada.pdf>. Acesso em 07 abr. 2014.

MITHÖFER, A. Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 10, p. 440-444, 2002.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLOA, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 105–114, 2003.

MONTESINOS, E., BONATERRA, A., BADOSA, E., FRANCÉS, J., ALEMANY, J., LLORENTE, I., MORAGREGA, C. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, v. 5, p. 169-175, 2002.

MORAES, R.M.A.; JOSÉ, I.C.; RAMOS, F.G.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 725-729, 2006.

MOTAVALLI, P.P.; KREMER, R.J.; FANG, M.; MEANS, N.E. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. **J. Environ. Qual.**, v. 33, p. 816-824, 2004.

MUNDT, J.O.; HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 32, n. 5, p. 694–698, 1976.

NORSWORTHY, J.K.; FREDERICK, J.R. Reduced seedling rate for glyphosate-resistant, drilled soybean on the Southeastern Coastal Plain. **Agronomy Journal**, v. 94, p. 1282-1288, 2002.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of Azospirillum as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 415–424, 1995.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ L.M.; AYUB, R.A.; COLAUTO, N.B.; FERNANDEZ, M.A. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS genetics**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2011.

PRIMOMO, V.S.; FALK, D.E.; ABLETT, G.R.; TANNER, J.W.; RAJCAN, I. Genotype × environment interactions, stability, and agronomic performance of soybean with altered fatty acid profiles. **Crop Science**, v. 42, n. 1, p. 37-44, 2002.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends In Microbiology**, v. 6, p. 139-144, 1998.

RICHETTI, A. Viabilidade econômica da cultura da soja na safra 2013/2014, em Mato Grosso do Sul. **Comunicado Técnico**, EMBRAPA, n. 187, 2013.

ROMEIRO, R.S. **Identificação de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1976. 91 p.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.

ROSSETO, P.B. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2008. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SAHAY, N.S.; VARMA A. *Piriformospora indica*: A new biological hardening tool for micropropagated plants. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 181, p. 297-302, 1999.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; ZORNOZA, P. Mitigation of Cu stress by legume-Rhizobium symbiosis in white lupin and soybean plants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 102, p. 1-5, 2014.

SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R. L.R.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.

SELOSSE, M. A., BAUDOIN, E., VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Compters Rendus Biologies**, v. 327, p. 639-648, 2004.

SENTHILKUMAR, M.; SWARNALAKSHMI, K.; GOVINDASAMY, V.; LEE, Y.K.; ANNAPURNA, K. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. **Curr. Microbiol.**, v. 58, p. 288–293, 2009.

SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; WEILHARTER, A.; KRAUSE, A.; WOYKE, T.; MITTER, B., HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, F.; RAHALKAR, M.; HUREK, T.; SARKAR, A.; BODROSSY, L.; VAN OVERBEEK, L.; BRAR, D.; VAN ELSAS, J.D.; REINHOLD-HUREK, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 25, n. 1, p. 28-36, 2012.

SHENPAGAM, N.H.; KANCHANA, D.; SINDUJA, G.; SANDHYA, R. Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its mutational effect in biocontrol activity. **IJPSR**, v. 3, n. 11, p. 4338-4344, 2012.

SIMAS, R.C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia no infravermelho próximo**. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química)—Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SINGH, R.K.; MALIK, N.; SINGH, S. improved nutrient use efficiency increases plant growth of rice with the use of IAA-overproducing strains of endophytic *Burkholderia cepacia* strain RRE25. **Microb. Ecol.**, v. 66, p. 375–384, 2013.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biol. Fertil. Soils**, v. 25, p. 13–19, 1997.

STURZ, A.V.; CHRISTIES, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1-30, 2000.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Appl. Soil Ecol.**, v. 15, p. 183-190, 2000.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16SrDNA sequence analysis. **Microb. Ecol.**, v. 55, p. 415–424, 2008.

SUZUKI, T.; SHIMIZU, M.; MEGURO, A.; HASEGAWA, S.; NISHIMURA T.; KUNOH, H. Visualization of infection of an endophytic Actinomycete *Streptomyces galbus* in leaves of tissue-cultured *Rhododendron*. **Actinomycetologica**, v. 19, n.1, p. 7–12, 2005.

TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L.; HOFFMAN, A.; WEYENS, N.; BARAC, T.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 3, p. 748-57, 2009.

TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; HOFFMAN, A.; ZHANG, Y-B.; WALLA, M.D.; VANGRONSVELD, J.; NEWMAN, L.; MONCHY, S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS genetics**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2010.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 1016-1024, 1979.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.

WEILHARTER, A.; MITTER, B.; SHIN, M.V.; CHAIN, P.S.G.; NOWAK, J.; SESSITSCH, A. Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 13, p. 3383-3384, 2011.

YAMADA, T.; CASTRO, P.R.C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. Encarte Técnico, **Informações Agronômicas**, n. 119, 2007.

ZHAO, L.; XU, Y.; SUN, R.; DENG, Z.; YANG, W.; WEI, G. Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain mq23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 567-575, 2011.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D. HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.

3 ARTIGO: DIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA EM SOJA TRANSGÊNICA E CONVENCIONAL

3.1 RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram avaliar a diversidade bacteriana endofítica cultivável presente em soja transgênica e convencional e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente estas bactérias de acordo com características relacionadas à promoção do crescimento de plantas. Bactérias endofíticas isoladas de raízes, caules e folhas de soja transgênica resistente a glifosato e convencional, cultivadas em diferentes locais, foram avaliadas. Houve diferença significativa no número de isolados recuperados entre os diferentes tecidos e cultivares, assim como entre as diferentes espécies de bactérias identificadas pelo sequenciamento parcial do gene 16S DNAr. Algumas espécies foram identificadas como produtoras de AIA e solubilizadoras de fosfato *in vitro*. De maneira geral, o maior número de isolados foi obtido em raízes e em cultivares transgênicas. As espécies *Pantoea agglomerans* e *Variovorax paradoxus* apresentaram características relacionadas à promoção do crescimento de plantas e são candidatas potenciais para o desenvolvimento de inoculantes. O estudo demonstrou diferenças em termos de densidade e composição da comunidade bacteriana em soja convencional e transgênica.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas, soja resistente a glifosato, AIA, exopolissacarídeos, solubilização de fosfato, motilidade, interação planta-bactéria.

DIVERSITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN CONVENTIONAL AND TRANSGENIC SOYBEAN CULTIVARS

ABSTRACT

The aims of the study were to assess the diversity among the culturable endophytic bacterial population present in non-transgenic and transgenic soybean and characterize them phenotypically and genotypically focusing on characteristics related to plant growth promotion. Endophytic bacteria isolated from roots, stems and leaves of non-transgenic and glyphosate-resistant transgenic (GR) soybean, grown in different locations, were phenotypically and genotypically evaluated. There was

significant difference in the number of isolates recovered among different tissues and cultivars, as well as among different species of bacteria identified by partial sequencing of the 16S rDNA. Some species have been identified as high IAA producers and high phosphate solubilizing *in vitro*. In general, higher number of isolates was observed in roots, especially in GR cultivars. *Pantoea agglomerans* and *Variovorax paradoxus* showed characteristics related to plant growth promotion and are potential candidates for the development of inoculants. Our study demonstrated differences concerning the density and composition of the endophytic bacteria community in non-transgenic and transgenic soybean.

Keywords: Endophytic bacteria, glyphosate-resistant soybean, IAA, exopolysaccharides, phosphate solubilization, motility, bacteria-plant interaction.

3.2 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das principais *commodities* mundialmente, juntamente com arroz, trigo, cevada e milho (MORAES et al., 2006; LIU; PAN, 2011). Mais de 80% da soja cultivada no mundo é transgênica e resistente a herbicida, sendo que o Brasil é o segundo país com maior área cultivada (JAMES, 2012).

Considerando a importância da soja no consumo humano e animal, muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de desenvolver estratégias para aumentar a produtividade da cultura. Uma estratégia que vem sendo amplamente adotada é o uso do *Bradyrhizobium* para a fixação biológica de nitrogênio (MARGARET et al., 2011; BREAR et al., 2013; SÁNCHEZ-PARDO; ZORNOZA, 2014). Os efeitos benéficos devido à inoculação com *Bradyrhizobium* são conhecidos, especialmente em áreas onde a nodulação natural é inadequada. A habilidade de fixar N é um dos mais importantes critérios de seleção para leguminosas devido esta ser uma demanda básica para uma alta produtividade (FATIMA et al., 2007). Outra metodologia que vem sendo estudada é o uso de bactérias promotoras do crescimento de plantas.

Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB) incluem microrganismos que tem um relacionamento simbiótico com as plantas (por exemplo, *Rhizobia* spp., *Frankia* spp. e *Azospirillum brasiliense*), bactérias associativas que podem colonizar parcialmente ou

completamente o interior do tecido da planta, como as bactérias endofíticas, e as bactérias de vida livre. Muitos estudos têm sido conduzidos de maneira a identificar possíveis candidatos para a inoculação em soja (HUNG; ANNAPURNA, 2004; KUKLINSKI-SOBRAL et al., 2004; LI et al., 2008; ASSUMPÇÃO et al., 2009).

Os principais fatores que envolvem a promoção do crescimento de plantas por bactérias são a produção de ácido indolacético (AIA), a solubilização de fosfatos inorgânicos, a fixação biológica de nitrogênio e a produção de fatores antimicrobianos capazes de controlar patógenos. O AIA é um hormônio sintetizado em plantas com aparentemente nenhuma função para as células bacterianas e estudos têm sido desenvolvidos sobre os benefícios deste hormônio na interação planta-bactéria (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Bactérias produtoras de AIA influenciam o crescimento e desenvolvimento da planta por alterar a condição fisiológica e morfológica das raízes inoculadas, aumentando a absorção de nutrientes (SINGH et al., 2013).

O fósforo é um macronutriente essencial para o crescimento da planta, todavia, sua disponibilidade e solubilização no solo é baixa, tornando-se menos disponível para ser absorvido pelas plantas (ROLIM NETO et al., 2004). Para que o fósforo orgânico seja convertido a inorgânico e se torne disponível para as plantas, é necessário que ocorra uma hidrólise que promova esta clivagem (NAHAS, 2002). De acordo com Malboobi et al. (2009), bactérias solubilizadoras de fósforo inorgânico (Pi) facilitam a hidrólise de uma ampla gama de compostos de fósforo, resultando em uma maior produtividade e em uma redução no uso de agroquímicos.

As plantas têm um complexo ecossistema que abriga uma grande variedade de bactérias capazes de colonizar diferentes órgãos e tecidos como raízes, folhas, flores, frutas e sementes (HALLMANN et al., 1997; GRAY; SMITH, 2005), e que podem causar diversos efeitos no hospedeiro (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Entre as bactérias associadas a plantas, existem as bactérias endofíticas que são definidas como organismos que habitam por pelo menos um período de seu ciclo de vida o interior de uma planta (AZEVEDO et al., 2000) e que podem contribuir para a saúde e crescimento de seu hospedeiro, sem causar efeitos negativos sobre o seu desenvolvimento (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; SHENPAGAM et al., 2012). As bactérias endofíticas estão menos sujeitas aos estresses ambientais e à competição por nutrientes que tipicamente ocorre na rizosfera (HALLMANN et al., 1997; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2004; SANTOS et al., 2005).

Apesar do fato de as bactérias endofíticas estarem protegidas no interior do hospedeiro contra os estresses ambientais, existem vários fatores que podem as afetar qualitativa e quantitativamente, como por exemplo o genótipo da planta, que pode influenciar diretamente as bactérias associadas a plantas por causar mudanças nos exsudados radiculares e torná-los disponíveis aos grupos bacterianos, afetando a colonização por rizobactérias (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000); o estágio de desenvolvimento, como mostrado por Dala e Kulkarni (2013) em seu estudo com bactérias endofíticas associadas à soja, em que a população bacteriana aumentou conforme o desenvolvimento da planta e começou a decrescer no começo do estágio reprodutivo; e o manejo da cultura.

O manejo da cultura tem um grande impacto na comunidade microbiana, principalmente devido ao uso de agroquímicos. Recentemente, tem-se aumentado a preocupação com o uso intensivo de herbicidas devido o seu papel na poluição ambiental. O glifosato (N-fosfometil glicina) é um herbicida não-seletivo de elevada eficiência, amplamente utilizado devido ao seu controle efetivo de plantas daninhas, rápida inativação no solo e baixa toxicidade para mamíferos.

Sabe-se que a aplicação de glifosato acarreta em alteração na comunidade microbiana (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005), e que este pode ser tóxico para certos organismos ou até ser usado como fonte de energia e nutrientes por outros (BUSSE et al., 2001). Dallmann et al. (2010) observaram em seus estudos que o uso de glifosato em soja transgênica reduziu a microbiota fúngica do solo e não alterou significativamente a contagem bacteriana. Todavia, Arantes et al. (2007), avaliando dois tipos de solo, observaram que o glifosato reduziu a atividade microbiana, independentemente da calagem. De acordo com Kononova e Nesmeyanova (2002) a identificação de organismos capazes de mineralizar organofosforados, como o glifosato, usando-os como fonte de carbono e nitrogênio por meio de enzimas com especificidade elevada para estes compostos, está se tornando comum.

Sabe-se que tanto as bactérias endofíticas como as rizobactérias podem promover o crescimento de plantas. Entretanto há um interesse no estudo de bactérias endofíticas para entender o seu papel na promoção do crescimento de plantas e para o desenvolvimento de biofertilizantes, visando aumentar a produtividade das culturas (DUDEJA et al., 2012). Contudo, existem algumas etapas críticas relacionadas à manutenção da bactéria na planta, assim como o

estabelecimento da bactéria no interior da planta por causa da competição com a microbiota já presente na planta, que devem ser consideradas. Desta forma, uma possível estratégia seria o estabelecimento precoce de comunidades bacterianas isoladas do mesmo ambiente que as bactérias já presentes no hospedeiro, devido ao fato de que isolados nativos podem apresentar características mais favoráveis para serem utilizados como inoculantes quando comparados a estirpes exóticas (FORCHETTI et al., 2007).

Atualmente, pouco se sabe sobre bactérias endofíticas associadas à soja, sobre seus efeitos benéficos sobre a cultura e sobre a influência do ambiente na população bacteriana. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade da população bacteriana endofítica cultivável presente em raízes, caules e folhas de soja convencional e transgênica resistente a glifosato, cultivadas em diferentes ambientes, e caracterizá-las fenotipicamente e genotipicamente com respeito a características relacionadas à promoção do crescimento de plantas.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material Vegetal

Para o isolamento bacteriano foram utilizadas plantas de soja cultivadas em três locais (Tabela 3.1): Campos Novos/SC (27°24'06"S, 51°13'30"W), apresentando um solo do tipo Latossolo Roxo Alumínico (EMBRAPA, 2006) e um clima Cfa - subtropical, com verão quente, de acordo com a classificação de Köppen; Guarapuava/PR (25°23'43"S, 51° 27'29"W), com um Latossolo Roxo Alumínico e clima Cfb - temperado, com verão ameno; e Ponta Grossa/PR (25°05'42"S, 50° 09'43"W) com um Latossolo Vermelho e clima Cfb. Todas as cultivares foram obtidas de ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) pertencentes à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Soja (EMBRAPA). Foi realizada a coleta ao acaso de três plantas de cada cultivar em cada local experimental no estádio R6 (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

3.3.2 Coleta das Amostras de Folhas, Raízes e Caules, e Determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

As amostras de folhas, raízes e caules das plantas, coletadas em triplicata, foram submetidas a lavagens seriadas com água, álcool 75%, hipoclorito (2%) e solução salina de fosfato esterilizado (PBS - 1,44 g de Na_2HPO_4 ; 0,24 g de KH_2PO_4 ; 0,20 g de KCl ; 8,00 g de NaCl ; pH 7,4). As amostras foram pesadas e maceradas em 1 mL de tampão PBS. As suspensões obtidas foram utilizadas para contagem e isolamento a partir da diluição seriada (1:10, v:v) em tampão PBS até a diluição 10^{-3} , segundo a metodologia de Döbereiner, Baldani e Baldan (1995); as diluições subsequentes foram inoculadas em meio de cultura solidificado sendo três repetições por diluição. Para o controle da desinfecção dos tecidos, foram realizados testes com amostras das plantas, colocando-as nas placas de Petri e observando-se a ausência crescimento de fungos e bactérias no meio. Os meios de cultivo utilizados foram o Nutrient Agar (NA) acrescido de glicerol 20%, e Trypticase Soy Agar (TSA), de acordo com a metodologia de Kado e Heskett (1970) e Döbereiner, Baldani e Baldan (1995) respectivamente.

Tabela 3.1 - Locais, manejo da cultura e dados de coleta das cultivares convencionais e transgênicas utilizadas no trabalho.

Campos Novos/Santa Catarina		
Cultivar	BRQ09-11694	BMX Energia
	Convencional	Transgênica resistente a glifosato
Plantio	10/11/2012	15/11/2012
Coleta	04/04/2013	04/04/2013
Manejo do solo	Plantio direto com 360 kg ha ⁻¹ de NPK 00-12-12	Plantio direto com 360 kg ha ⁻¹ de NPK 00-12-12
Herbicidas	Glifosato no pré-plantio e Fusiflex [®] no pós-plantio	Glifosato em pré e pós-plantio
Fungicidas	Opera [®] , Sfer [®] e Fox [®]	Opera [®] , Sfer [®] e Fox [®]
Guarapuava/Paraná		
Cultivar	BRQ09-11694	BMX Energia
	Convencional	Transgênica resistente a glifosato
Plantio	15/11/2012	20/11/2012
Coleta	04/04/2013	04/04/2013
Manejo do solo	Plantio direto com 350 kg ha ⁻¹ de NPK 00-20-20	Plantio direto com 350 kg ha ⁻¹ de NPK 00-20-20
Herbicidas	Glifosato no pré-plantio e Fusiflex [®] no pós-plantio	Glifosato em pré e pós-plantio
Fungicidas	Opera [®] , Sfer [®] e Fox [®]	Opera [®] , Sfer [®] e Fox [®]
Ponta Grossa/Paraná		
Cultivar	BRS 361	BRS 245 RR
	Convencional	Transgênica resistente a glifosato
Plantio	18/11/2012	13/11/2012
Coleta	11/04/2013	11/04/2013
Manejo do solo	Plantio direto com 300 kg ha ⁻¹ de NPK 00-20-20	Plantio direto com 300 kg ha ⁻¹ de NPK 00-20-20
Herbicidas	Glifosato no pré-plantio e Cobra [®] e Flex [®] no pós-plantio	Glifosato em pré e pós-plantio -
Fungicidas	Opera [®] e Priori [®]	Opera [®] e Priori [®]

3.3.3 Isolamento das Bactérias Endofíticas

Após a incubação, as colônias foram estriadas, individualmente, em placas de Petri contendo os mesmos meios em que haviam sido cultivadas anteriormente, incubadas a 30 °C por 2 a 3 dias e, em seguida, armazenadas a 4 °C. Posteriormente, colônias escolhidas ao acaso isoladas nos meios NA e TSA, foram cultivadas em meio líquido Nutrient Broth (NB) e Caldo Triptona Soja (TSB), respectivamente, por 18 h a 30 °C sob agitação constante. Cada isolado bacteriano foi suspenso com glicerol esterilizado 15% e armazenados a -80 °C.

3.3.4 Caracterização Fenotípica dos Isolados Bacterianos

As seguintes metodologias foram utilizadas para caracterizar os isolados:

3.3.4.1 Produção de ácido indolacético (AIA)

Todos os isolados foram caracterizados quanto à produção de AIA de acordo com a metodologia utilizada por Loper e Schroth (1986). As culturas bacterianas foram inoculadas no meio de cultura NB acrescido de triptofano (5 mg ml⁻¹) e incubados a 30 ± 2 °C por um dia. As culturas foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 min. Duas gotas de ácido ortofosfórico e 4 ml do reagente de Salkowski (50 ml de 35% ácido perclórico; 1 mL de 0,5 mL FeCl₃) foram adicionados a 2 mL de sobrenadante. Os isolados foram classificados conforme o desenvolvimento de uma coloração avermelhada em: (-) ausência de coloração, ou seja, não produção de AIA; (+) leve coloração, pouca produção; (++) média coloração, média produção; (+++) coloração intensa, alta produção de AIA.

3.3.4.2 Solubilização de fosfato

A solubilização de fosfato foi determinada qualitativamente de acordo com a metodologia descrita por Nautiyal (1999) modificada. Os isolados bacterianos foram testados qualitativamente em ensaios em placas de Petri utilizando o meio NBRI-P [por litro: 10 g de glucose; 5 g de fosfato natural de Gafsa;

5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$]. As bactérias foram estriadas nas placas e incubadas a 30 °C por 7 dias. A formação de um halo ao redor das colônias indica que os isolados possuem a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico; os isolados foram classificados em: (-) ausência de halo, ou ausência de atividade; (+) halo pequeno (1 – 2 mm), pouca atividade; (++) halo médio (2 – 4 mm), atividade mediana; (+++) halo grande (superior a 4 mm), alta atividade.

3.3.4.3 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

A produção de EPS foi testada pelo cultivo de colônias isoladas no meio *Yeast Extract Mannitol* (YM) (por litro: 0,5 g de extrato de levedura e 4 g de manitol suplementado com 15 g de ágar), como descrito anteriormente por Zlosnik et al (2008). A produção foi monitorada visualmente de acordo com a morfologia da colônia e seu aspecto viscoso; os isolados foram classificados em (-) ausência de produção de EPS; (+) pouca produção; (++) média produção; (+++) alta produção.

3.3.4.4 Produção de sideróforos

A metodologia utilizada para detectar sideróforos foi adaptada do ensaio químico universal em placas de Petri contendo *Chrome Azurol S* (CAS) (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Os isolados foram estriados nas placas e incubados a 30 ± 2 °C por 2 dias. A produção de sideróforos foi mensurada pelo tamanho do halo alaranjado formado ao redor das colônias utilizando o mesmo critério de classificação anterior.

3.3.4.5 Atividade enzimática

A atividade proteolítica foi avaliada pelo cultivo dos isolados em placas de Petri contendo leite em pó (1,0%), extrato de levedura (0,01%), KH_2PO_4 (0,15%), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05%) NaCl (0,5%) e ágar (1,5%); os isolados foram incubados a 30 °C por 18 h.

A atividade lipídica foi detectada utilizando o método *TBA plate* de acordo com Kumar et al. (2012) (por litro: 5 g de bacto-peptona; 3 g de extrato de

levedura; 10 g de Tributirin; 12 g de ágar). As bactérias foram estriadas em placas de Petri contendo o meio TBA e incubadas a 30 °C por 18 h.

A atividade quitinolítica foi mensurada utilizando-se o meio *Bacillus Minimal Medium* (BMM) (para uma solução de 100 ml: 0,65 g de KH_2PO_4 ; 1,5 g de K_2HPO_4 ; 0,25 g de NaCl; 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,12 g de MgCl_2 ; 0,12 g de MgSO_4 ; ZnSO_4 , FeCl_3 e CaCl_2 foram adicionados até uma concentração final de 10^{-6} mol L^{-1}) acrescido de quitina coloidal (1,0%) preparada a partir de quitina comercial de acordo com o método de Wen et al. (2002).

A degradação de quitina e atividades proteolítica e lipolítica foram avaliadas pela mensuração do halo formado ao redor das colônias e utilizando o mesmo método de classificação anteriormente descrito: (+) pouca atividade; (++) média atividade; (+++) alta atividade.

3.3.4.6 Motilidade: *swarming* e *swimming*

O teste de *swarming* foi realizado utilizando placas com o meio M8 contendo uma concentração de 0,5% ágar (300 mL de H_2O ; 1,5 g de ágar; 9,07 g de Na_2HPO_4 ; 1,8 g de KH_2PO_4 ; 0,3 g de NaCl; 1,2 g de glucose; 0,3 g de ácido glutâmico; 1,2 mL de MgSO_4 1M; 50 μL de CaCl_2 1M) como descrito anteriormente por Murray e Kazmierczak (2006). A inoculação foi feita pipetando-se 0,5 μL de uma cultura crescida durante a noite no centro da placa de Petri com o meio. As placas foram incubadas a 30 °C de 24 a 48 h.

O teste de *swimming* foi realizado em placas contendo o meio M8 com uma concentração de 0,25% de ágar. A inoculação e incubação foi realizada da mesma forma que o teste de *swarming*.

A classificação foi dada quanto ao crescimento dos isolados na placa, onde: (-) ausência de motilidade; (+) pouca motilidade; (++) média motilidade; (+++) alta motilidade.

3.3.5 Caracterização Genotípica dos Isolados

Isolados selecionados com base em suas características fenotípicas foram submetidos à análise filogenética do gene 16S DNAr. O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando-se o *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Life

Technologies). O gene 16S DNAr foi parcialmente amplificado em reações de PCR utilizando os primers 338F e 778R, e 27F e 800R, como descrito na literatura (LANE, 1991; ANZAI; KUDO; OYAIZU, 1997; RÖSCH; BOTHE, 2005; XING et al., 2008). A sequência de nucleotídeos foi determinada pelo sequenciamento dos produtos da PCR, purificados com o *PureLink® Quick Gel Extraction Kit* (Life Technologies), realizado pela empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, South Korea). As sequências foram comparadas e analisadas com outras sequências presentes no *GenBank®* utilizando o programa BLAST disponível no website do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os alinhamentos múltiplos das sequências (Clustal W), bem como a construção das árvores filogenéticas (parâmetros padrão, algoritmo *neighbor-joining*) foram esquematizados no programa MEGA v. 6.0 (www.megasoftware.net/). Suporte estatístico para os nós da árvore foi avaliado por análises de *bootstrap* com 1000 repetições.

3.3.6 Análise dos Dados

As médias de UFC foram determinadas a partir dos valores observados nas diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , com três repetições de cada diluição. A análise dos dados de UFC foram transformados em logaritmo de base 10 e submetidos aos pressupostos da análise de variância. Para os dados com distribuição normal, foram realizadas a ANAVA e o teste de Tuckey a 5% de probabilidade. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variância de Kruskal-Wallis e as médias foram comparadas pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

3.4 RESULTADOS

A densidade bacteriana endofítica obtida de raízes, caules e folhas de soja transgênica e convencional cultivadas em diferentes locais foram estimadas. Os valores de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de peso fresco verificados nos diferentes tecidos e localidades estão descritos na Tabela 3.2. Como não foram utilizadas as mesmas cultivares, assim como o mesmo manejo em todos os locais de coleta, não foi possível fazer uma comparação dos valores entre os diferentes locais, todavia foram feitas comparações entre as plantas convencionais e

transgênicas separadamente para cada ambiente.

O teste de Shapiro-Wilk revelou que o número de isolados recuperados das raízes, caules e folhas de soja convencional e transgênica cultivada em Campos Novos/SC, não apresentou distribuição normal. Assim sendo, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e as médias foram comparadas pelo teste de Dunn. Não foi observada diferença significativa entre os diferentes tecidos, porém foi observada diferença significativa entre as cultivares, sendo que, o maior número de isolados encontrados em raízes e caules foi observado na cultivar transgênica, enquanto que o maior número de isolados recuperados das folhas foi observado na cultivar convencional (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Comunidade bacteriana endofítica obtida de diferentes tecidos de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR) cultivada em diferentes locais.

Locais	Tecidos	Nº. bactérias (\log_{10} UFC g^{-1} peso fresco)	
		C	GR
Campos Novos/SC ^a	Raízes	0,00 B a	1,99 A a
	Caules	0,00 B a	2,16 A a
	Folhas	2,07 A a	1,57 B a
Guarapuava/PR ^b	Raízes	1,97 B a	3,28 A a
	Caules	1,00 A b	1,20 A c
	Folhas	1,23 B b	2,74 A b
Ponta Grossa/PR ^b	Raízes	2,70 A a	2,79 A a
	Caules	2,90 A a	2,05 B b
	Folhas	0,00 B b	2,41 A ab

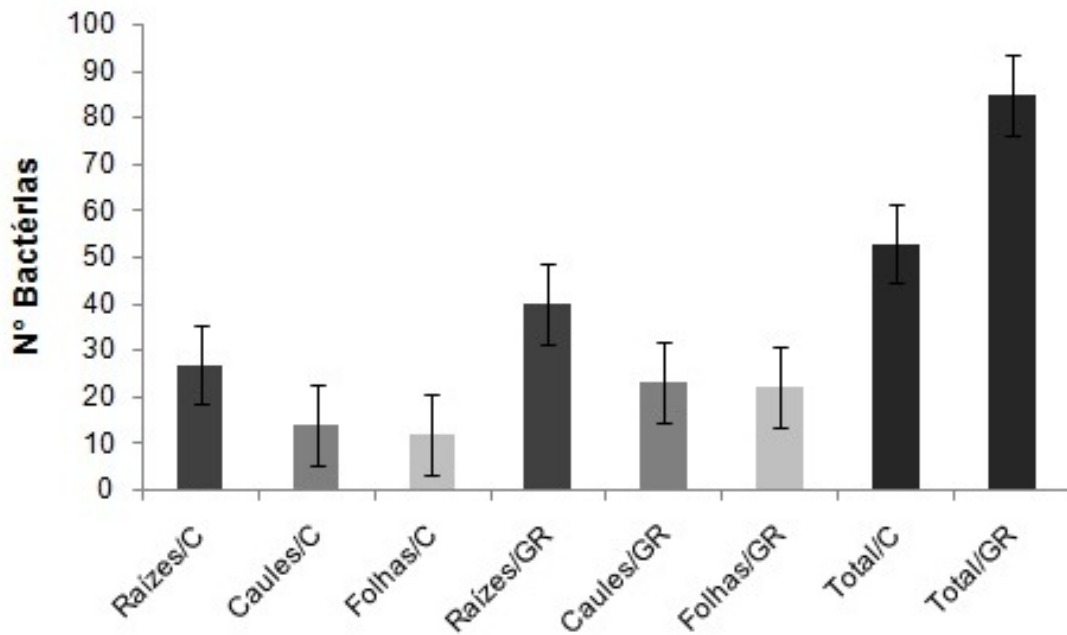
^aMédias seguidas pela mesma letra maiúscula (horizontal) e minúscula (vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). ^bMédias seguidas pela mesma letra maiúscula (horizontal) e minúscula (vertical) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Entre o número de isolados recuperados da soja cultivada em Guarapuava/PR, foi observada diferença significativa entre os tecidos de cada cultivar, onde o maior número observado em ambas as cultivares foram nas raízes. Já entre as cultivares, foi observada diferença significativa entre os isolados obtidos de raízes e folhas, sendo que o maior número de isolados foi observado na cultivar transgênica.

Em Ponta Grossa/PR, foi observada diferença estatística entre todos os tecidos, exceto as raízes. Na cultivar convencional, o caule foi o tecido que apresentou o maior número de isolados recuperados, não diferindo estatisticamente

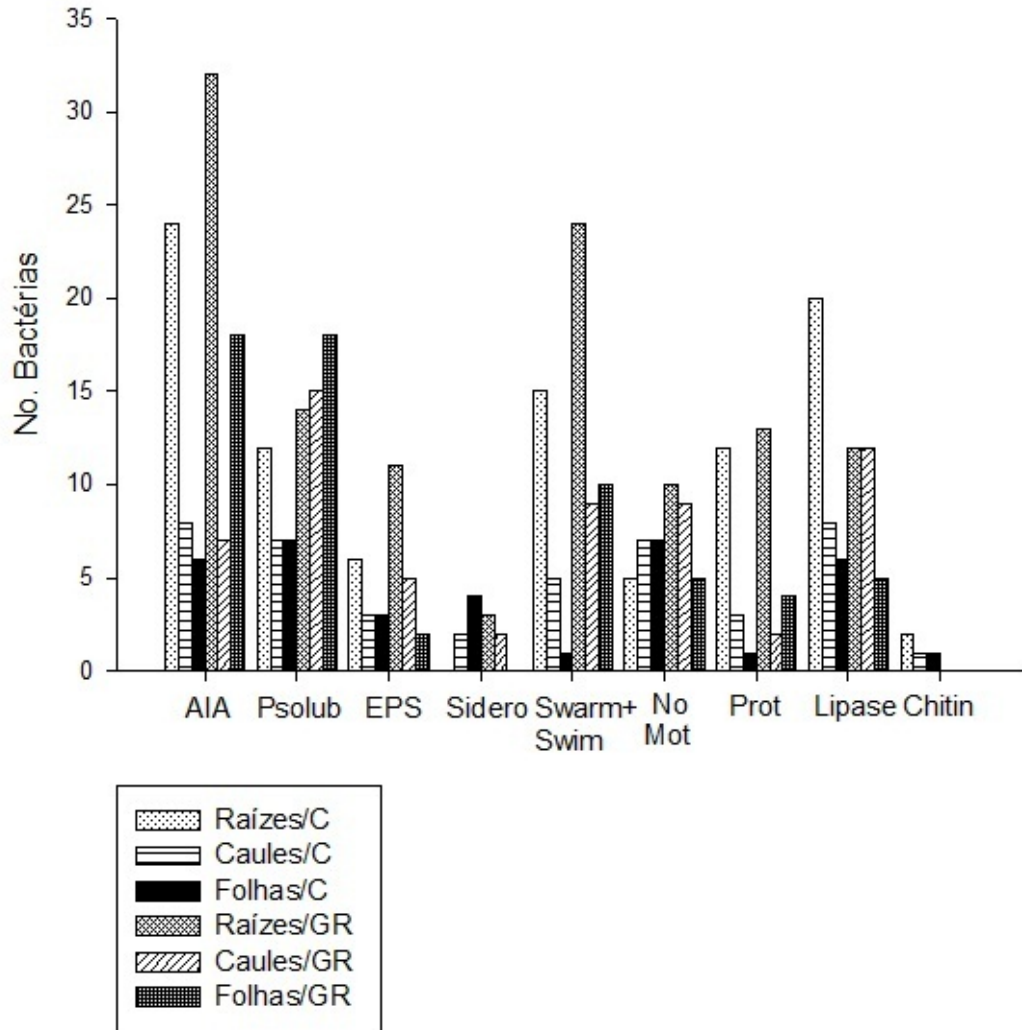
das raízes. Na cultivar transgênica, a raiz foi o tecido com o maior número de isolados, não diferindo significativamente das folhas. De maneira geral, as cultivares transgênicas foram as que apresentaram o maior número de isolados recuperados, sendo que a maioria deles foi obtida de raízes (Figura 3.1).

Figura 3.1 – Densidade populacional total de bactérias endofíticas isoladas de raízes caules e folhas de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR).



Analisando características relacionadas à promoção do crescimento, dos 138 isolados recuperados, foi observado que aproximadamente 69,0% dos isolados (95 estirpes) foram capazes de sintetizar AIA *in vitro*, sendo 38 destes obtidos de cultivares convencionais (24 de raízes, 8 de caules e 6 de folhas) e 57 de transgênicas (32 de raízes, 7 de caules e 18 de folhas). Em ambas as cultivares, o maior número de isolados produtores de AIA foi obtido de raízes (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Número de bactérias endofíticas isoladas de raízes, caules e folhas de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR) que produzem ácido indolacético (AIA), solubilizam fosfato (Psolub), produzem exopolissacarídeos (EPS) e sideróforos (Sidero), apresentam motilidade (Swarm+Swim) ou são imóveis (No Mot.) e que produzem protease (Prot.), lipase e quitinase (Chitin).



Aproximadamente 53,0% das bactérias endofíticas estudadas são capazes de solubilizar fosfatos inorgânicos, onde os maiores números de isolados foram observados em raízes de cultivares convencionais (12) e folhas de cultivares transgênicas (18). Em relação ao total de isolados avaliados, apenas 35,5% (49) produziam AIA e solubilizavam fosfato, a maioria deles obtidos de cultivares transgênicas. Diferentes níveis de síntese de AIA e solubilização de fosfato foram observados.

A produção de EPS foi detectada em 30 isolados (22,0%), a maioria deles obtidos de raízes. A habilidade de produzir sideróforos foi observada em

apenas 11 isolados (8,0%), sendo 6 deles obtidos de soja convencional e 5 de soja transgênica.

Um total de 46,0% das bactérias endofíticas (64) apresentou motilidade (ambos *swarming* e *swimming*), sendo que 31,0% (43) se mostraram imóveis nas condições testadas. O maior número de bactérias com motilidade em ambas as cultivares foi observado nas raízes. Nas cultivares convencionais e transgênicas, o número de isolados recuperados de raízes, caules e folhas que apresentam motilidade foi 15, 5, 1 e 24, 9, 10, respectivamente (Figura 3.2).

Com relação à secreção de enzimas, 35 isolados (25,0%) produziram protease, 63 (46%) lipase e 4 (3%) quitinase. O maior número de bactérias produtoras de lipase e quitinase foi observado em raízes de cultivares transgênicas. Um total de 60 isolados (43%) não produziram nenhuma das enzimas avaliadas, sendo que apenas dois isolados produziram todas as enzimas em teste.

Baseado em características relacionadas à promoção do crescimento de plantas, como a produção de AIA, a solubilização de fosfato e a atividade antagônica contra patógenos de soja (dados não apresentados), 54 isolados foram selecionados para serem submetidos à caracterização genotípica (Tabela 3.3).

Dentre todos os isolados identificados pela homologia com o gene ribossomal 16S, as espécies *Enterobacter ludwigii* e *Variovorax paradoxus* foram as que apresentaram o maior número de isolados observados (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Análise das sequências do gene ribossomal 16S e caracterização fenotípica das bactérias endofíticas isoladas de raízes (R), caules (C) e folhas (F) de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR), cultivadas em Ponta Grossa/PR (PG), Campos Novos/SC (CN) e Guarapuava/PR (G).

Isolado	Correspondência com o NCBI	% Ident	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolu ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Próto ^b	Lipase ^b	Chitin ^b
1	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	99	C	R	PG	+	++	-	-	+	++	-	+	-
2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98	C	R	PG	++	-	+	-	+	+	-	+	-
3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98	GR	C	CN	-	-	+++	-	+	++	-	-	-
4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99	GR	R	PG	+++	-	+++	-	+++	+++	-	-	-
5	<i>Arthrobacter globiformis</i>	97	C	F	G	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	98	GR	R	PG	++	-	+	-	-	+	+	-	-
7	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	97	GR	R	PG	+	+	-	-	-	-	+	-	-
8	<i>Arthrobacter niigatensis</i>	92	GR	C	CN	++	+	-	-	-	-	-	+	-
9	<i>Bacillus aryabhatai</i>	95	GR	R	CN	++	+	-	-	-	-	+	+	-
10	<i>Bacillus subtilis</i>	95	C	C	PG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Burkholderia cepacia</i>	97	C	R	PG	++	++	-	-	+	++	+	++	-
12	<i>Burkholderia cepacia</i>	98	C	R	PG	+	+	-	-	+	++	+	+++	-
13	<i>Burkholderia cepacia</i>	99	C	R	PG	++	++	+	-	++	+++	+	-	-
14	<i>Citrobacter freundii</i>	98	GR	R	PG	+	-	-	-	+	+++	-	-	-
15	<i>Citrobacter freundii</i>	99	GR	C	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	91	C	F	CN	+	-	-	+	-	+	+	++	+
17	<i>Enterobacter asburiae</i>	99	GR	C	CN	+	+	-	-	+	+++	-	-	-
18	<i>Enterobacter asburiae</i>	95	GR	R	PG	++	-	++	-	+++	+++	-	-	-
19	<i>Enterobacter asburiae</i>	98	GR	R	PG	+	-	++	-	+++	+++	-	-	-
20	<i>Enterobacter cloacae</i>	93	C	R	PG	++	-	-	-	-	++	+	++	+
21	<i>Enterobacter ludwigii</i>	95	C	F	CN	-	+++	+++	-	++	+++	-	-	-

Tabela 3.3 – Continuação.

Isolado	Correspondência com o NCBI	% Ident	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swar ^{m^d}	Swi ^{m^d}	Prot ^b	Lipase ^b	Chitin ^b
22	<i>Enterobacter ludwigii</i>	98	C	R	PG	+	-	-	-	++	+++	-	-	-
23	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99	GR	R	PG	+	-	+	-	+++	+++	-	-	-
24	<i>Enterobacter ludwigii</i>	90	GR	R	PG	+++	++	+	-	+	++	-	-	-
25	<i>Enterobacter ludwigii</i>	95	GR	F	PG	++	+	-	-	+	++	-	+	-
26	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99	GR	C	PG	++	+	+++	-	+++	+++	-	-	-
27	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99	GR	R	PG	+	++	+++	-	+++	+++	-	-	-
28	<i>Enterobacter</i> sp.	98	C	C	G	+	++	+++	-	+	+++	-	-	-
29	<i>Kosakonia cowanii</i>	99	GR	F	CN	-	++	-	-	++	+++	-	-	-
30	<i>Kosakonia cowanii</i>	90	GR	R	G	+	++	-	-	+	+++	+	-	-
31	<i>Microbacterium binotii</i>	99	GR	R	PG	+	-	-	+	-	-	-	-	-
32	<i>Microbacterium takaoensis</i>	96	C	R	PG	+	-	-	-	-	-	-	-	-
33	<i>Nocardioideas alkalitolerans</i>	96	GR	C	G	+	-	-	-	-	+	+	+	-
34	<i>Pantoea agglomerans</i>	84	GR	R	CN	+++	++	-	-	-	++	-	-	-
35	<i>Pantoea agglomerans</i>	97	GR	F	PG	+++	++	-	-	-	+++	-	-	-
36	<i>Pantoea agglomerans</i>	93	GR	F	PG	+++	++	-	-	+	+++	-	-	-
37	<i>Pantoea stewartii</i>	89	GR	R	PG	+	++	-	-	+	+++	-	-	-
38	<i>Pseudomonas fulva</i>	100	C	F	CN	+	++	++	-	-	+	-	-	-
39	<i>Ralstonia insidiosa</i>	99	C	R	G	+	++	-	-	-	+	-	+++	-
40	<i>Rhizobium pusense</i>	94	GR	R	PG	++	-	+++	-	++	+	-	-	-
41	<i>Serratia symbiotica</i>	85	GR	R	PG	+++	++	-	-	-	-	+	-	-
42	<i>Staphylococcus aureus</i>	97	C	C	PG	+	-	-	-	-	-	-	+	+
43	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	99	C	F	G	-	+	-	-	-	-	-	+++	-

44	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	98	C	C	PG	-	+	-	+++	-	-	-	++	-
45	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	95	C	R	PG	++	++	-	-	-	+	+++	-	-

Tabela 3.3 – Continuação.

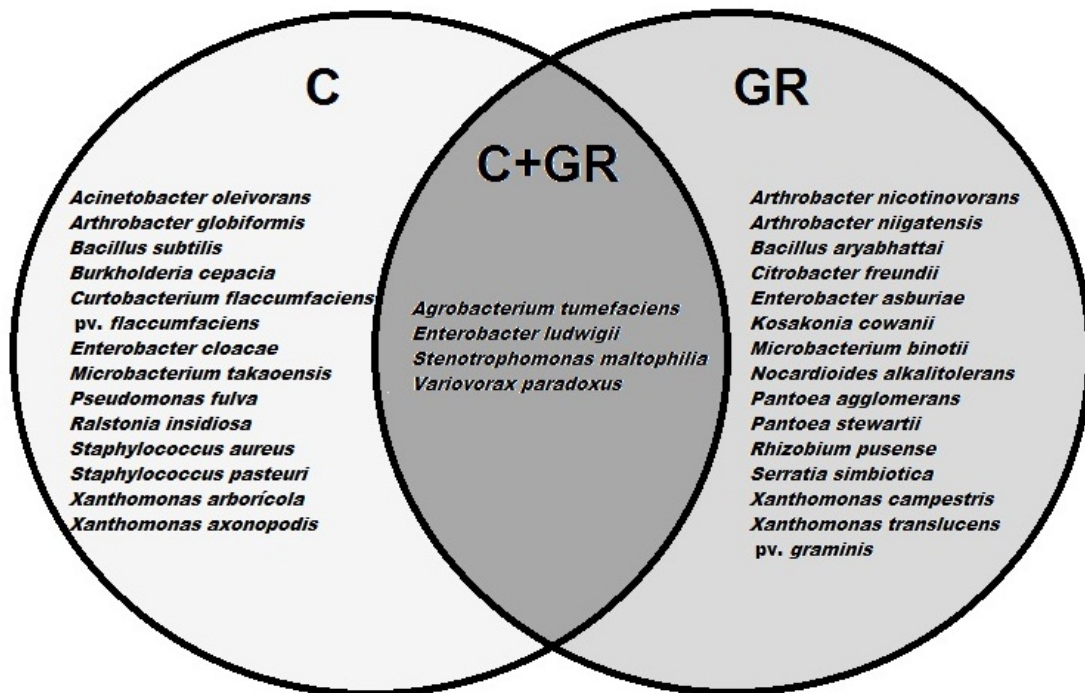
Isolado	Correspondência com o NCBI	% Ident	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Prot ^b	Lipase ^b	Chitin ^b
46	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98	GR	R	G	+	-	-	-	+	++	+++	+	-
47	<i>Variovorax paradoxus</i>	99	C	R	G	+	-	++	-	-	+	-	++	-
48	<i>Variovorax paradoxus</i>	90	GR	R	CN	+	-	-	-	++	++	++	+++	-
49	<i>Variovorax paradoxus</i>	90	GR	F	PG	+	+++	-	-	++	++	-	-	-
50	<i>Variovorax paradoxus</i>	88	GR	F	PG	+	+++	++	-	+	++	-	-	-
51	<i>Xanthomonas arboricola</i>	95	C	C	PG	+	+	-	-	+	+	+++	++	-
52	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	96	C	R	PG	+	-	-	-	+	+	+++	+	-
53	<i>Xanthomonas campestris</i>	95	GR	F	PG	+	+	++	-	++	-	+++	-	-
54	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i>	96	GR	R	PG	+	-	-	-	-	+	+++	++	-

AIA-produção de ácido indolacético; Psolub-solubilização de fosfato; EPS-produção de exopolissacarídeos; Sidero-produção de sideróforos; Swarm-Swarming; Swim-Swimming; Prot-produção de protease; Lipase-produção de lipase; Chitin-produção de quitinase.

^a Produção de AIA: (-) ausência de coloração, ou seja, não produção de AIA; (+) leve coloração, pouca produção; (++) média coloração, média produção; (+++) coloração intensa, alta produção de AIA. ^b Solubilização de fosfato, sideróforos, protease, lipase e quitinase: (-) ausência de halo, ou ausência de atividade; (+) halo pequeno (1 – 2 mm), pouca atividade; (++) halo médio (2 – 4 mm), atividade mediana; (+++) halo grande (superior a 4 mm), alta atividade. ^c Produção de EPS: (-) ausência de produção de EPS; (+) pouca produção; (++) média produção; (+++) alta produção. ^d Motilidade: (-) ausência de motilidade; (+) pouca motilidade; (++) média motilidade; (+++) alta motilidade.

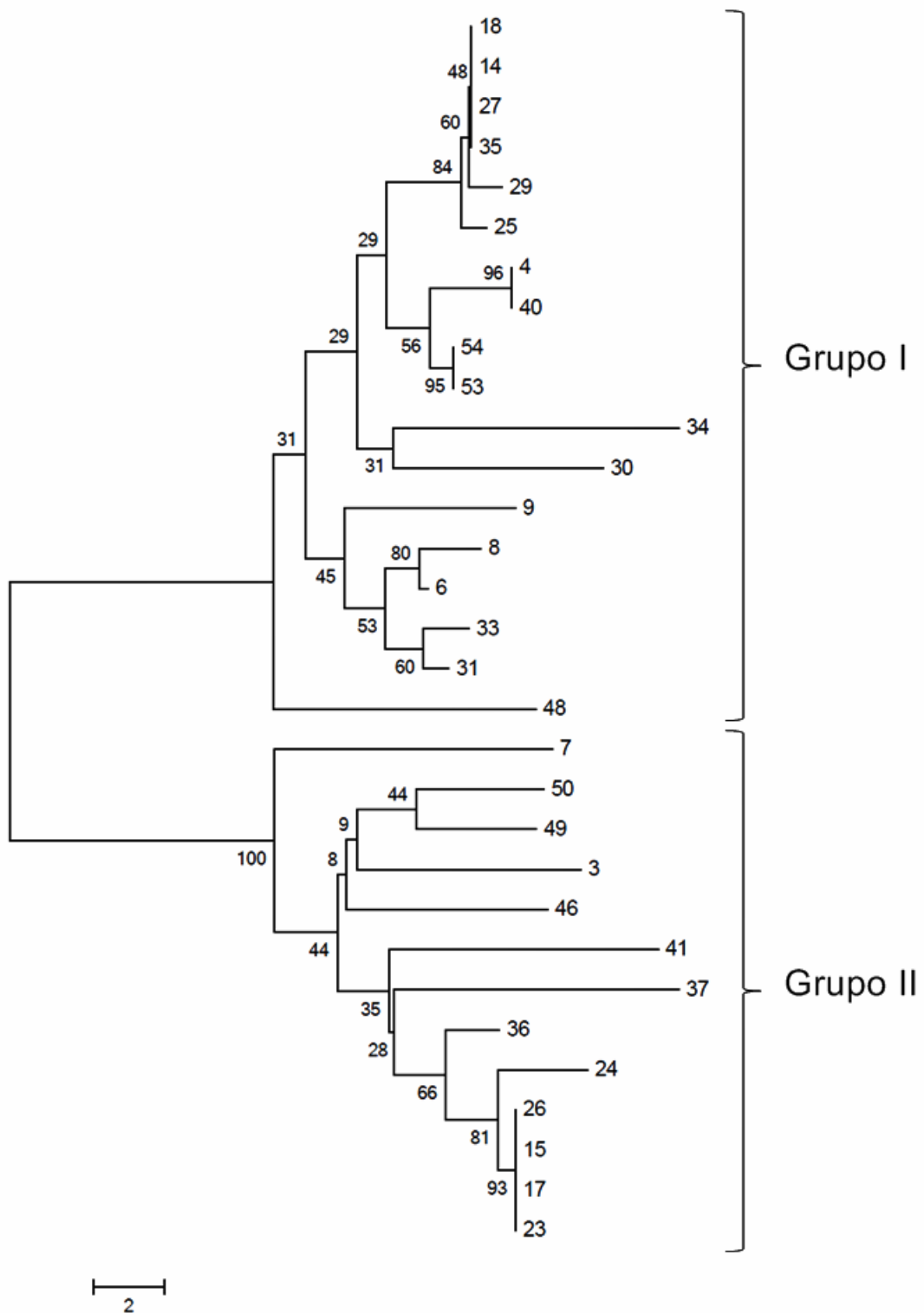
Enquanto que determinadas espécies de bactérias foram encontradas exclusivamente em soja convencional e outras em soja transgênica, as espécies *A. tumefaciens*, *E. ludwigii*, *S. maltophilia* e *V. paradoxus* foram observadas nos dois tipos de soja cultivada (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Espécies de bactérias endofíticas encontradas apenas em soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR), e em ambas as cultivares (C+GR).



As sequências parciais do gene 16S DNAr obtidas foram alinhadas e a relação filogenética entre as bactérias isoladas das cultivares convencionais (Figura 3.4) e transgênicas (Figura 3.5) foram avaliadas pela construção de uma árvore filogenética usando o algoritmo *neighbor-joining*. Observou-se uma maior homogeneidade entre os grupos de linhagens recuperadas de cultivares convencionais do que entre o grupo de linhagens recuperadas de cultivares transgênicas resistentes a glifosato.

Figura 3.5 – Árvore filogenética obtida pelo método do algoritmo *neighbor-joining* construída utilizando as sequências de nucleotídeos parciais do gene 16S DNAr obtidas de bactérias endofíticas isoladas de diferentes tecidos de soja transgênica resistente a glifosato. Os valores em cada ramo representam porcentagens de 1.000 réplicas *bootstrap*.



Verificou-se que os 22 isolados obtidos de soja convencional se

agruparam em dois grupos filogenéticos distintos principais, sendo o grupo I constituído por 14 isolados, agrupando os isolados solubilizadores de P; e o grupo II constituído por oito isolados. Os isolados 51 e 52, 21 e 28, 42 e 44, e 11 e 12, apresentaram valores acima de 98% de similaridade entre as suas sequências amplificadas do gene 16S DNAr (Figura 3.4).

A árvore filogenética construída a partir das sequências parciais do gene 16S DNAr das bactérias endofíticas recuperadas de cultivares transgênicas resistente a glifosato agrupou as 32 linhagens em dois grupos principais. O grupo I agrupou 18 isolados e apresentou maior heterogeneidade quando comparado ao grupo II que agrupou 14 isolados (Figura 3.5).

Considerando os diferentes tecidos analisados no estudo, *E. ludwigii* foi a única espécie encontrada em todos os tecidos. Os isolados *Acinetobacter oleivorans*, *Arthrobacter nicotinovorans*, *Bacillus arayabhatai*, *B. cepacia*, *E. cloacae*, *Microbacterium binotii*, *M. takaoensis*, *Pantoea stewartii*, *Ralstonia insidiosa*, *R. pusense*, *Serratia symbiotica*, *S. maltophilia*, *X. axonopodis* e *X. translucens* pv. *graminis* foram observados exclusivamente em raízes; *Arthrobacter niigatensis*, *Bacillus subtilis*, *Norcardioides alkalitolerans*, *Staphylococcus pasteurii* e *X. arboricola*, exclusivamente em caules; e *Arthrobacter globiformis*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas fulva* e *X. campestris*, exclusivamente em folhas. Além disso, as raízes foram os tecidos que apresentaram a maior diversidade bacteriana endofítica.

Dentre as 54 bactérias endofíticas identificadas pelo sequenciamento do gene ribossomal 16S (Tabela 3.3), 24 produziam AIA e solubilizavam fosfato, onde 5 deles (*P. agglomerans* – isolados 34, 35 e 36; e *V. paradoxus* – isolados 49 e 50), todos obtidos de plantas transgênicas, apresentaram os maiores índices de atividade *in vitro* para ambas as características.

Apesar de a produção de enzimas, como protease e lipase, ter sido relativamente frequente entre os isolados identificados, apenas três sintetizavam quitinase; estes isolados são: *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (isolado 16), *E. cloacea* (isolado 20) e *Staphylococcus aureus* (isolado 42). O isolado *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foi o que apresentou a maior atividade de produção de quitinase *in vitro*.

3.5 DISCUSSÃO

Bactérias endofíticas são definidas como bactérias que habitam o interior do tecido de plantas por pelo menos um período de seu ciclo de vida (AZEVEDO et al., 2000) sem causar prejuízos ao hospedeiro. Apesar do fato de as endofíticas estarem protegidas contra estresses ambientais, existem diversos fatores que podem afetar a população bacteriana no interior das plantas, como a espécie hospedeira, o tecido e o estágio de desenvolvimento, mudanças no metabolismo da planta, aplicação de agroquímicos, como o glifosato, e interações com outros microrganismos (ZINNIEL et al., 2002; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005; ANDREOTE et al., 2010).

No presente estudo, foram verificadas diferenças significativas entre a comunidade de bactérias endofíticas nos diferentes tecidos de duas, das três localidades avaliadas, e, de maneira geral, as raízes apresentaram o maior número de UFC g⁻¹ de peso fresco, seguidas pelos caules e folhas. Resultados similares foram encontrados por Kuklinsky-Sobral et al. (2004) e Dalal e Kulkarni (2013), sugerindo que as bactérias endofíticas entram nas plantas através de sementes em germinação ou através das raízes, e migram para os outros tecidos.

O maior número de isolados que apresentaram motilidade foi verificado também em raízes. É interessante notar que enquanto nas cultivares convencionais o número de isolados com motilidade foi maior em raízes, seguido pelos caules e folhas, sugerindo um gradiente da população/densidade bacteriana das raízes para as folhas, nas cultivares transgênicas o número de isolados foi maior nas raízes, menor nos caules, e novamente alto nas folhas. Este fato não é evidente quando se consideram os isolados que não apresentam motilidade. Ambos os dados sugerem que a motilidade é um fator importante para a colonização da planta, assim como foi comprovado por Hao et al. (2012). De acordo com os autores, o *swarming* facilitou o movimento de bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* através dos exudatos viscoso das raízes.

A população bacteriana variou não apenas entre os tecidos, mas também entre as cultivares em todos os locais estudados. Certos gêneros foram encontrados especificamente em cultivares convencionais e outros apenas em cultivares transgênicas. Também foi observada diferença na homologia entre os isolados recuperados, sendo que bactérias obtidas de cultivares transgênicas

mostraram maior divergência entre si do que as obtidas de cultivares convencionais, sugerindo um papel desempenhado pela tolerância ao glifosato das plantas e também pela sua aplicação sobre estas, na seleção da população bacteriana endofítica de soja.

Estudos prévios também evidenciaram diferenças na comunidade endofítica isolada de diferentes tecidos e genótipos (RASCHE et al., 2006; İNCEOĞLU et al., 2010; İNCEOĞLU et al., 2011; DIAS et al., 2013). Estudos comparando a diversidade da população bacteriana presentes na rizosfera de plantas transgênicas e convencionais de canola mostraram que há um impacto na abundância e diversidade das rizobactérias devido a modificação genética da planta (SICILIANO; GERMIDA, 1999; DUNFIELD; GERMIDA, 2001; DUNFIELD; GERMIDA, 2003). Corroborando estes resultados, Dias et al. (2013) encontraram quantidades variáveis de *Pseudomonas* e *Burkholderia* na rizosfera de batatas geneticamente modificadas quando estas foram comparadas ao seu isogene, indicando que o genótipo também tem influência na comunidade microbiana presente na rizosfera de batata.

Assumpção (2008), avaliando sementes de soja convencionais e transgênicas, encontrou que a comunidade bacteriana endofítica isolada de sementes de soja geneticamente modificada apresentavam maior diversidade quando comparadas às sementes não transgênicas.

Estudos de proteômica em sementes de soja mostraram que existem diferenças entre os níveis de certas proteínas observadas em soja transgênica e convencional (GARCÍA-VILLALBA et al., 2008; BRANDÃO et al., 2010; BARBOSA et al., 2012). Este fato pode influenciar a população bacteriana no interior das plantas. Entretanto, no presente estudo não foi possível comparar a cultivar transgênica com o seu isogene devido este não estar disponível, sendo assim não se pôde concluir que a diferença observada foi devido à modificação genética.

Além do tecido e genótipo, existem outros fatores que também podem afetar a comunidade bacteriana no interior do hospedeiro, como a temperatura e o local em que a planta é cultivada e o manejo da cultura. Egamberdiyeva e Hoflich (2003), avaliando bactérias promotoras do crescimento de plantas obtidas de trigo cultivado em diferentes solos e temperaturas, observou que as espécies *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Pantoea agglomerans*, isoladas de um clima semi-continental, foram responsáveis por um maior aumento

no crescimento de raízes e plântulas de trigo de inverno a 16 °C, do que quando o trigo foi cultivado a 26 °C.

Os diferentes tipos de solo onde o hospedeiro é cultivado também têm grande influência sobre a comunidade bacteriana endofítica. Long et al. (2010), avaliando a influência dos diferentes tipos de solo e da transgenia para a regulação da biossíntese de etileno sobre a diversidade de bactérias endofíticas presente em *Nicotiana attenuata*, verificaram que a população de endofíticas dependia significativamente do genótipo e do solo, sendo que, em média, a colonização dos genótipos selvagens (não transgênicos) foi maior, porém variável entre os solos, e que as plantas cultivadas em solos orgânicos apresentavam mais bactérias.

No presente estudo foi observado que a densidade de bactérias endofíticas em soja convencional cultivada em Campos Novos/SC foi menor que as demais, além do que o número de UFC g⁻¹ de peso fresco encontrado em folhas e raízes desta cultivar foi zero. Analisando as informações contidas na Tabela 3.1 observa-se que as datas de plantio e coleta e o manejo são similares para todas as cultivares. As únicas diferenças entre todos os locais avaliados, são o clima e o tipo de solo. A cidade de Campos Novos/SC é caracterizada por apresentar um clima do tipo Cfa, de acordo com a classificação de Köppen, onde geralmente as temperaturas são altas e ocorrem precipitações durante o verão, enquanto que Guarapuava/PR e Ponta Grossa/PR têm um clima do tipo Cfb, caracterizado por ser um clima temperado, com precipitação uniformemente distribuída e ocorrências frequentes de geadas.

Sabe-se que o manejo da cultura tem uma grande influência sobre a comunidade bacteriana endofítica. Estudos já demonstraram que a aplicação de herbicidas, tal como o glifosato, pode resultar em alterações na comunidade microbiana em plantas (BUSSE et al., 2001; ANDREOTE et al., 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005).

O glifosato é responsável por inibir a enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) da via do ácido chiquímico, envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos. A via do ácido chiquímico é ubíqua em microrganismos, todavia alguns grupos microbianos são capazes de usar o glifosato como fonte de energia e nutrientes (BUSSE et al., 2001), enquanto que para outros grupos, este pode ser tóxico (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005). Portanto, é

possível que a aplicação de glifosato possa induzir uma alteração na comunidade bacteriana endofítica de algumas plantas.

O presente estudo indicou diferenças na abundância e na diversidade da comunidade bacteriana endofítica entre as cultivares de soja convencionais e transgênicas resistentes a glifosato. Todavia, não se pôde concluir que a aplicação de glifosato foi a responsável pela diferença estatística observada devido a existência de outros fatores também responsáveis pela alteração na comunidade microbiana, como condições do experimento, fatores ambientais, temperatura, características do solo, entre outros, que não foram isolados. Além disso, a seletividade do meio de cultivo também podem causar alterações na população de bactérias.

Estudos a campo sobre a interação entre o sistema de manejo de soja convencional e de soja transgênica resistente a glifosato e a sua influência sobre a comunidade bacteriana não têm sido explorados. A fim de proporcionar melhores informações visando um manejo mais efetivo da cultura, estudos envolvendo experimentos a campo e a análise independente do cultivo de bactérias, devem ser realizados de forma a melhorar a compreensão da interação entre a aplicação de herbicidas e a comunidade bacteriana associada a plantas.

Sabe-se que algumas bactérias endofíticas podem contribuir para a saúde e crescimento de seu hospedeiro atuando diretamente pela produção de fitormônios, suplementação de nitrogênio e atuação na solubilização de fosfatos (BASHAN, 1998; VESSEY, 2003; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; KANG et al., 2007), ou indiretamente por serem antagônicas a certos fitopatógenos (KANG et al., 2007).

Neste trabalho foram identificadas bactérias que apresentam uma alta capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfatos inorgânicos *in vitro* pertencentes às espécies *P. agglomerans* e *V. paradoxus*. Kuklinsky-sobral et al. (2004), encontraram bactérias associadas a soja pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Ralstonia* que também apresentaram características relacionadas a promoção do crescimento de plantas. A presença de bactérias no interior do hospedeiro que apresentam características relacionadas à promoção do crescimento de plantas *in vitro* pode ter importância para a saúde da planta e também é potencialmente interessante para o desenvolvimento de inoculantes. Entretanto, os isolados devem ser testados também *in vivo* para as

mesmas propriedades a fim de verificar se o resultado se mantém.

Em estudos anteriores, algumas bactérias pertencentes ao mesmo gênero dos isolados identificados neste estudo foram testadas *in vivo* e apresentaram um desempenho eficiente quando testadas como inoculantes. Bertrand et al. (2001), estudando bactérias promotoras do crescimento em canola, verificou que plantas inoculadas com *Pseudomonas migulae*, *A. tumefaciens*, *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Phyllobacterium rubiacearum* e *V. paradoxus* apresentaram um aumento significativo no peso seco de raiz. Jiang et al. (2012) observaram que a inoculação de *V. paradoxus* em *Pisum sativum* promoveu um aumento na biomassa de raízes e plântulas. Parra-Cota et al. (2014), testando a inoculação de *Burkholderia ambifaria* e *B. caribensis* inoculados em Amarantho constataram que foram capazes de promover o crescimento da planta e de aumentar a sua produtividade.

Para o desenvolvimento de inoculantes, algumas características relacionadas à colonização e estabelecimento da bactéria na planta devem ser consideradas. Neste trabalho, dentre todos os isolados que apresentavam características interessantes para a promoção do crescimento de plantas, apenas o isolado 50 (*V. paradoxus*) também produzia EPS. Sabe-se que os microrganismos que produzem exopolissacarídeos têm uma maior proteção contra estresses ambientais, antibióticos e defesas do hospedeiro (BRANDA et al., 2005). A produção de sideróforos também é uma característica interessante devido o seu papel na complexação do ferro (CATTELAN, 1999) permitindo com que a bactéria que tem essa capacidade tenha melhores condições de sobreviver em ambientes limitados de ferro e sejam mais competitivas nesse aspecto. Todavia, nenhum dos isolados identificados como potenciais promotores do crescimento de plantas produziram sideróforos.

O interesse em bactérias endofíticas não é somente devido suas propriedades como promotoras do crescimento de plantas, mas também devido o seu potencial no biocontrole de patógenos de plantas. No presente estudo foram encontradas poucas bactérias capazes de hidrolisar quitina *in vitro*: *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *E. cloacae* e *Staphylococcus aureus*. Um grande interesse tem sido gerado sobre a produção de quitinases devido sua possível aplicação no biocontrole de patógenos fúngicos de plantas (YE; NG, 2005; MUKHERJEE; SEM, 2006; PRAPAGDEE; KUEKULVONG; MONGKOLSUK, 2008).

Brzezinska e Jankiewicz (2012), avaliando a produção de quitinase por *Aspergillus* sp. observaram que a quitinase inibia o crescimento *in vitro* de *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Hoster, Schmitz e Daniel (2005) mostraram que a quitinase produzida por 13 diferentes bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* teve uma alta atividade antifúngica.

O estudo da associação entre plantas e bactérias é importante para a compreensão do papel ecológico da bactéria em sua interação com o hospedeiro e também para a utilização destas bactérias no desenvolvimento de produtos biotecnológicos visando a promoção do crescimento de plantas e o controle de doenças. O presente estudo demonstrou diferenças em termos de densidade e composição da população bacteriana endofítica em soja convencional e transgênica. No presente estudo foi reportado pela primeira vez a abundância de bactérias endofíticas presente em folhas de soja transgênica. As informações reportadas no trabalho podem ser utilizadas futuramente para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para a promoção do crescimento de plantas.

3.6 CONCLUSÕES

As espécies *Pantoea agglomerans* e *Variovorax paradoxus* apresentaram características relacionadas à promoção do crescimento de plantas e são candidatas potenciais para o desenvolvimento de inoculantes.

3.7 REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **J. Microbiol.**, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANZAI, Y.; KUDO, Y.; OYAIZU, H. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, p. 249–251, 1997.
- ANDREOTE, F.D.; ROCHA, U.N.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; VAN OVERBEEK, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389–399, 2010.
- ARANTES, S. A. C. M.; LOVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L. Efeito da calagem e do glyphosate na atividade microbiana de diferentes classes de solos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, p. 19-28, 2007.
- ASSUMPÇÃO, L.C. **Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico**. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.
- ASSUMPÇÃO, L.C.; LACAVAL, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant-growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.
- BARBOSA, H.S.; ARRUDA, S.C.C.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A.Z. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 299–314, 2012.
- BERTRAND, H.; NALIN, R.; BALLY, R.; CLEYET-MAREL, J.-C. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). **Biol. Fertil. Soils**, v. 33, p. 152-156, 2001.
- BRANDA, S.S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 1, 2005.
- BRANDÃO, A.R.; BARBOSA, H.S.; ARRUDA, M.A.Z. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-

transgenic soybean seeds. **Journal of proteomics**, v. 73, . 1433-1440, 2010.

BREAR, E.M.; DAY, D.A.; SMITH, P.M.C. Iron: an essential micronutrient for the legume–rhizobium symbiosis. **Front. Plant. Sci.**, v. 4, p. 1-15, 2013.

BRZEZINSKA, M.S.; JANKIEWICZ, U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Curr. Microbiol.**, v. 65, p. 666–672, 2012.

BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1777-1789, 2001.

CATTELAN, A.J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Embrapa soja, Documentos, 139, ISSN 1516-781X, 1999. 36p.

DALAL, J.; KULKARNI, N. Population dynamics and diversity of endophytic bacteria associated with soybean. **British Microbiology Research Journal**, v. 3, n. 1, p. 96-105, 2013.

DALLMANN, C.M.; SCHENEIDER, L.; BOHM, G.M.B.; KUHN, C.R. Impacto da aplicação de glifosato na microbiota do solo cultivado com soja geneticamente modificada. **Revista Thema**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2010.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; HANNULA, S.E.; ANDREOTE, F.D.; SILVA, M.C.P.; SALLES, J.F.; BOER, W.; VAN VEEN, J.; VAN ELSAS., J.D. Different selective effects on rhizosphere bacteria exerted by genetically modified versus conventional potato lines. **Plosone**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2013.

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

DUDEJA, S.S.; GIRI, R.; SAINI, R.; SUNEJA-MADAN, P.; KOTHE, E. Review: Interaction of endophytic microbes with legumes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 248–260, 2012.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 38 p. 1-9, 2001.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 12, p. 7310-7318, 2003.

EGAMBERDIYEVA, D.; HOFlich, G. Influence of growth- promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. **Soil Biol. Biochem.**, v. 35, p. 973–978, 2003.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2 ed. Rio de Janeiro :

EMBRAPA-SPI, 2006. 306 p.

FARIAS, J.R.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da soja. **Circular Técnica 48**, Embrapa, Londrina, PR, p. 1-9, 2007.

FATIMA, Z.; ZIA, M.; CHAUDHARY, M.F. Interactive effect of Rhizobium strains and P on soybean yield, nitrogen fixation and soil fertility. **Pak. J. Bot.**, v. 39, n. 1, p. 255-264, 2007.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 76, p. 1145-1152, 2007.

GARCÍA-VILLALBA, R.; LEÓN, C.; DINELLI, G.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GARCIA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A. Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 164–173, 2008.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109–117, 1995.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biol. Biochem.**, v. 37, p. 395–412, 2005.

HALLMANN J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, WF.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 895–914, 1997.

HAO, L.; WILLIS, D.K.; ANDREWS-POLYMENIS, H.; MCCLELLAND, M.; BARAKA, J.D. Requirement of siderophore biosynthesis for plant colonization by *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4561–4570, 2012.

HOSTER, F.; SCHMITZ, J.E.; DANIEL, R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 66, p. 434–442, 2005.

HUNG, P.Q.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). **Omonrice**, v. 12, p. 92-101, 2004.

İNCEOĞLU, Ö.; SALLES, J.F.; VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J.D. Effects of plant genotype and growth stage on the betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 3675-3684, 2010.

İNCEOĞLU, Ö.; AL-SOUD, W.A.; SALLES, J.F.; SEMENOV, A.V.; VAN ELSAS, J.D.

Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. **Plosone**, v. 6, n. 8, p. 1-11, 2011.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012. **ISAAA Brief**, n. 44, p. 1-329, 2012.

JIANG, F.; CHEN, L.; BELIMOV, A.A; SHAPOSHNIKOV, A.I.; GONG, F.; MENG, X.; HARTUNG, W.; JESCHKE, D.W.; DAVIES, W.J.; DODD, I.C. Multiple impacts of the plant growth-promoting rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 on nutrient and ABA relations of *Pisum sativum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 18, p. 6421–6430, 2012.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969-976, 1970.

KANG, S.H.; HYUN-SOO, C.; HOON, C.; CHOONG-MIN, R.; JIHYUN, F.K.; SEUNG-HWAN, P. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, n. 1, p. 96-103, 2007.

KONONOVA, S.V.; NESMEYANOVA, M.A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 220-233, 2002.

KOZDROJ, J.; VAN ELSAS; J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p 1405-1417, 2000.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–125, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v. 273, p. 91–99, 2005.

KUMAR, D.; KUMAR, L.; NAGAR, S.; RAINA, C.; PARSHAD, R.; GUPTA, V.K. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Archives of Applied Science Research**, v. 4, n. 4, p. 1763-1770, 2012.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. Chichester: Wiley, 1991. p. 115-175.

LONG, H.H.; SONNTAG, D.G.; SCHMIDT, D.D.; BALDWIN, I.T. The structure of the culturable root bacterial endophyte community of *Nicotiana attenuata* is organized by soil composition and host plant ethylene production and perception. **New**

Phytologist, v. 185, p. 554-567, 2010.

LI, J.H.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 238–246, 2008.

LIU, C.F.; PAN, T.M. Beneficial Effects of bioactive peptides derived from soybean on human health and their production by genetic engineering. In: EL-SHEMY, H. **Soybean and health**. China: Intech, 2011. p. 311-328.

LOPER, J.E.; SCHROTH, M.N. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p.386-389, 1986.

MALBOOBI, M.A.; BEHBAHANI, M.; MADANI, H.; OWLIA, P.; DELJOU, A.; YAKHCHALI, B.; MORADI, M.; HASSANABADI, H. Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 1479-1484, 2009.

MARGARET, I.; BECKER, A.; BLOM, J.; BONILLA, I.; GOESMANN, A.; GÖTTFERT, M.; LLORET, J.; MITTARD-RUNTE, V.; RÜCKERT, C.; RUIZ-SAINZ, J.E.; VINARDELL, J.M.; WEIDNER, S. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 1, p.11–19, 2011.

MORAES, R.M.A.; JOSÉ, I.C.; RAMOS, F.G.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 725-729, 2006.

MUKHERJEE, G.; SEN, S.K. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10. **Current Microbiology**, v. 53, p. 265–269, 2006.

MURRAY, T.S.; KAZMIERCZAK, B.I. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v.188, p.6995–7004, 2006.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 267-275, 2002.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.170, n.1, p.265-70, 1999.

PARRA-COTA, F.I.; PEÑA-CABRIALES, J.J.; SANTOS-VILLALOBOS, S.; MARTÍNEZ-GALLARDO, N.A.; DÉLANO-FRIER, J.P. *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain Amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. **Plosone**, v. 9, n. 2, p. 1-14, 2014.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against

phytopathogenic fungi. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 4, p. 330-337, 2008.

RASCHE, F.; HÖDL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 56, p. 219–235, 2006.

ROLIM NETO, F.C.; SCHAEFER, C.E.G.R.; COSTA, L.M.; CORRÊA, M.M.; FERNANDES FILHO, E.I.; IBRAIMO, M.M. Adsorção de fósforo, superfície específica e atributos mineralógicos em solos desenvolvidos de rochas vulcânicas do alto paranaíba (MG). **R. Bras. Ci. Solo**, v. 28, p. 953-964, 2004.

RÖSCH, C.; BOTHE, H. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 2026-2035, 2005.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Arch. Microbiol.**, v. 181, p. 337-344, 2004.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; ZORNOZA, P. Mitigation of Cu stress by legume-Rhizobium symbiosis in white lupin and soybean plants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 102, p. 1-5, 2014.

SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R. L.R.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.

SCHWYN, B., NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem.**, v.160, p.46–56, 1987.

SHENPAGAM, N.H.; KANCHANA, D.; SINDUJA, G.; SANDHYA, R. Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its mutational effect in biocontrol activity. **IJPSR**, v. 3, n. 11, p. 4338-4344, 2012.

SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 263-272, 1999.

SINGH, R.K.; MALIK, N.; SINGH, S. Improved nutrient use efficiency increases plant growth of rice with the use of IAA-overproducing strains of endophytic *Burkholderia cepacia* strain RRE25. **Microb. Ecol.**, v. 66, p. 375–384, 2013.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.

WEN, C.M.; TSENG, C.S.; CHENG, C.Y.; LI, Y.K. Purification, characterization and

cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, p. 213–219, 2002.

XING, D.; REN, N.; WANG, A.; LI, Q.; FENG, Y.; MA, F. Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 1489-1495, 2008.

YE, X.; NG, T.B. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 230-236, 2005.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D. HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.

ZLOSNIK, J.E.; HIRD, T.J.; FRANKEL, M.C.; MOREIRA, L.M.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p.1470–1473, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Caracterização genotípica e fenotípica de bactérias endofíticas isoladas de raízes (R), caules (C) e folhas (F) de soja convencional (C) e transgênica resistente a glifosato (GR), cultivadas em Ponta Grossa/PR (PG), Campos Novos/SC (CN) e Guarapuava/PR (G).

Colado	Correspondência com o NCBI	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Prot ^b	Lipase ^b
1		C	C	G	-	-	-	+	-	-	-	+++
2		C	C	G	-	+	++	-	-	+	-	+
3		C	C	G	+	-	+	-	+++	+++	-	-
4	<i>Enterobacter</i> sp.	C	C	G	+	+++	+++	-	+	+++	-	-
5	<i>Xanthomonas arboricola</i>	C	C	PG	+	+	-	-	+	+	+++	++
6	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	C	C	PG	-	+	-	+++	-	-	-	++
7	<i>Bacillus subtilis</i>	C	C	PG	-	-	-	-	-	-	-	-
8		C	C	PG	+	+	-	-	-	-	+	+
9		C	C	PG	+	+	-	-	+	+++	-	-
10		C	C	PG	+	+	-	-	-	-	-	+
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	C	C	PG	+	-	-	-	-	-	-	+
12		C	C	PG	+	-	-	-	+	+	++	-
13		C	C	PG	-	-	-	-	-	-	-	+
14		C	F	CN	+	-	-	-	-	-	-	-
15		C	F	CN	-	++	++	-	-	-	-	-
16	<i>Pseudomonas fulva</i>	C	F	CN	+	++	++	-	-	+	-	-
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>											
17		C	F	CN	+	-	-	+	-	+	+++	++
18		C	F	CN	+	-	-	-	+	++	-	+++
19		C	F	CN	+	+	-	-	-	-	-	-
20	<i>Enterobacter ludwigii</i>	C	F	CN	-	+++	+++	-	++	+++	-	-
21		C	F	G	-	-	-	+	-	-	-	++

APÊNDICE A

Continuação.

Colado	Correspondência com o NCBI	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Prot ^b	Lipase ^b
22	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	C	F	G	-	+	-	-	-	-	-	+++
23		C	F	G	-	+	-	+	-	+++	-	+++
24	<i>Arthrobacter globiformis</i>	C	F	G	+	-	-	-	-	-	-	-
25		C	F	G	-	+	-	+	-	-	-	+++
26	<i>Ralstonia insidiosa</i>	C	R	G	+	+++	-	-	-	+	-	+++
27	<i>Variovorax paradoxus</i>	C	R	G	+	-	++	-	-	+	-	++
28		C	R	G	-	+	-	-	-	+	-	+
29		C	R	G	-	-	-	-	+	+++	-	+
30		C	R	G	-	-	++	-	-	-	-	+++
31		C	R	G	+	+	+	-	-	-	-	++
32		C	R	G	-	+	-	-	-	+	+	++
33	<i>Burkholderia cepacia</i>	C	R	PG	+	+	-	-	+	++	+	+++
34		C	R	PG	+	-	-	-	++	+++	-	-
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>											
35		C	R	PG	++	++	-	-	-	+	+++	-
36		C	R	PG	++	-	-	-	-	+	++	+
37	<i>Microbacterium takaoensis</i>	C	R	PG	+	-	-	-	-	-	-	-
38		C	R	PG	+	-	-	-	+	+	++	+

39		C	R	PG	+	-	-	-	-	+	++	+
40		C	R	PG	+	-	-	-	++	+++	-	++
41	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	C	R	PG	+	-	-	-	+	+	+++	+
42		C	R	PG	+	-	-	-	+++	+++	-	+
43	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C	R	PG	++	-	+	-	+	+	-	+
44		C	R	PG	+	+	-	-	-	-	-	+
45	<i>Enterobacter cloacae</i>	C	R	PG	++	-	-	-	-	++	++	++
46		C	R	PG	+	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE A

Continuação.

Colado	Correspondência com o NCBI	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Prot ^b	Lipase ^b
47	<i>Burkholderia cepacia</i>	C	R	PG	++	++	-	-	+	++	+	++
48	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	C	R	PG	+	++	-	-	+	++	-	+
49		C	R	PG	+	+	-	-	+	+	++	-
50		C	R	PG	+	-	-	-	+	+++	-	+
51	<i>Enterobacter ludwigii</i>	C	R	PG	+	-	-	-	++	+++	-	-
52	<i>Burkholderia cepacia</i>	C	R	PG	++	++	+	-	++	+++	++	-
53		C	R	PG	+	+++	+++	-	++	+++	+++	-
54	<i>Arthrobacter niigatensis</i>	GR	C	CN	++	+	-	-	-	-	-	+
55		GR	C	CN	-	++	-	-	-	++	-	+
56		GR	C	CN	-	-	-	-	-	-	-	-
57		GR	C	CN	-	-	+++	-	+	++	-	-
58		GR	C	CN	-	+	++	-	+	-	-	+
59		GR	C	CN	-	-	-	-	++	+++	-	-
60	<i>Enterobacter asburiae</i>	GR	C	CN	+	+	-	-	+	+++	-	-
61		GR	C	CN	-	+	-	-	-	-	-	++
62	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GR	C	CN	-	-	+++	-	+	++	-	-
63		GR	C	CN	++	+	+	-	++	+++	-	-
64	<i>Enterobacter ludwigii</i>	GR	C	PG	++	+	+++	-	+++	+++	-	-
65		GR	C	PG	-	++	-	++	++	+++	-	++
66		GR	C	PG	-	-	-	-	+	+	-	+
67		GR	C	PG	-	++	-	-	-	-	-	-
68		GR	C	PG	-	+	-	-	-	++	-	-
69		GR	C	PG	+	+	-	-	+++	+++	-	++
70	<i>Kosakonia cowanii</i>	GR	F	CN	-	+++	-	-	++	+++	-	-
71		GR	F	CN	-	-	-	-	-	-	-	-
72		GR	F	CN	-	+	-	-	-	+	-	-

APÊNDICE A

Continuação.

Colado	Correspondência com o NCBI	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Prot ^b	Lipase ^b
73		GR	F	PG	+	-	-	-	+	+++	-	-
74		GR	F	PG	+	-	-	-	+	+++	+	-
75		GR	F	PG	+	+	-	-	-	-	-	-
76		GR	F	PG	+	-	-	-	+	+++	-	-
77	<i>Enterobacter ludwigii</i>	GR	F	PG	++	+	-	-	+	++	-	+
78		GR	F	PG	+	+	-	-	++	-	-	-
79	<i>Pantoea agglomerans</i>	GR	F	PG	+++	+++	-	-	-	+++	-	-
80		GR	F	PG	+	+	-	-	+	+++	++	-
81		GR	F	PG	+	++	-	-	-	++	+	+
82	<i>Xanthomonas campestris</i>	GR	F	PG	+	+	++	-	++	-	+++	-

83		GR	F	PG	++	++	-	-	-	-	-	+
84	<i>Pantoea agglomerans</i>	GR	F	PG	+++	+++	-	-	+	+++	-	-
85		GR	F	PG	+	++	-	-	-	++	-	++
86		GR	F	PG	+	+	-	-	-	-	-	-
87	<i>Variovorax paradoxus</i>	GR	F	PG	+++	+++	-	-	++	+++	-	-
88		GR	F	PG	+	++	-	-	+	+++	-	-
89	<i>Variovorax paradoxus</i>	GR	F	PG	+++	+++	++	-	+	+++	-	-
90		GR	F	PG	++	+	-	-	-	++	-	++
91		GR	F	PG	+	++	-	-	-	-	-	-
92		GR	R	CN	++	++	+	-	+++	+++	-	-
93		GR	R	CN	-	++	-	+	+	+++	-	-
94		GR	R	CN	-	-	-	-	-	-	-	-
95		GR	R	CN	-	++	-	-	+++	+++	-	-
96		GR	R	CN	+	-	-	-	+++	+++	-	-
97		GR	R	CN	-	++	-	-	+	++	+	+
98	<i>Bacillus aryabhatai</i>	GR	R	CN	++	+	-	-	-	-	+++	+

APÊNDICE A

Continuação.

Colado	Correspondência com o NCBI	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Prot ^b	Lipase ^b
99	<i>Variovorax paradoxus</i>	GR	R	CN	+++	-	-	-	++	++	++	+++
100	<i>Pantoea agglomerans</i>	GR	R	CN	+++	+++	-	-	-	++	-	-
101		GR	R	CN	-	-	++	+	-	-	-	++
102		GR	R	CN	+	-	-	-	-	+	-	+
103	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	GR	R	PG	+	+	-	-	-	-	++	-
104		GR	R	PG	+	-	-	-	+	+	++	-
105		GR	R	PG	-	-	-	-	+	+	-	-
106		GR	R	PG	-	-	-	-	-	+	-	-
107	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i>	GR	R	PG	++	-	-	-	-	+	+++	++
108	<i>Enterobacter ludwigii</i>	GR	R	PG	+	-	+	-	+++	+++	-	-
109		GR	R	PG	+	-	-	-	++	+++	-	-
110	<i>Enterobacter ludwigii</i>	GR	R	PG	+++	++	+	-	+	++	-	-
111		GR	R	PG	+	-	-	-	++	+++	-	++
112	<i>Pantoea stewartii</i>	GR	R	PG	+	++	-	-	+	+++	-	-
113	<i>Enterobacter asburiae</i>	GR	R	PG	+	-	++	-	+++	+++	-	-
114		GR	R	PG	++	-	+	-	-	-	-	-
115	<i>Citrobacter freundii</i>	GR	R	PG	+	-	-	-	+	+++	-	-
116		GR	R	PG	++	-	-	-	++	+++	-	-
117	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	GR	R	PG	++	-	+	-	-	+	+++	-
118		GR	R	PG	-	-	-	-	-	-	-	+
119	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GR	R	PG	+++	-	+++	-	+++	+++	-	-
120		GR	R	PG	++	-	-	-	+++	+++	++	-
121	<i>Enterobacter asburiae</i>	GR	R	PG	++	-	++	-	+++	+++	-	-
122		GR	R	PG	+++	++	-	-	-	++	+	+
123		GR	R	PG	+	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE A

Continuação.

Colado	Correspondência com o NCBI	Cultivar	Tecido	Local	AIA ^a	Psolub ^b	EPS ^c	Sidero ^b	Swarm ^d	Swim ^d	Prot ^b	Lipase ^b
124	<i>Serratia symbiotica</i>	GR	R	PG	+++	++	-	-	-	-	+	-
125	<i>Microbacterium binotii</i>	GR	R	PG	+	-	-	+	-	-	-	-

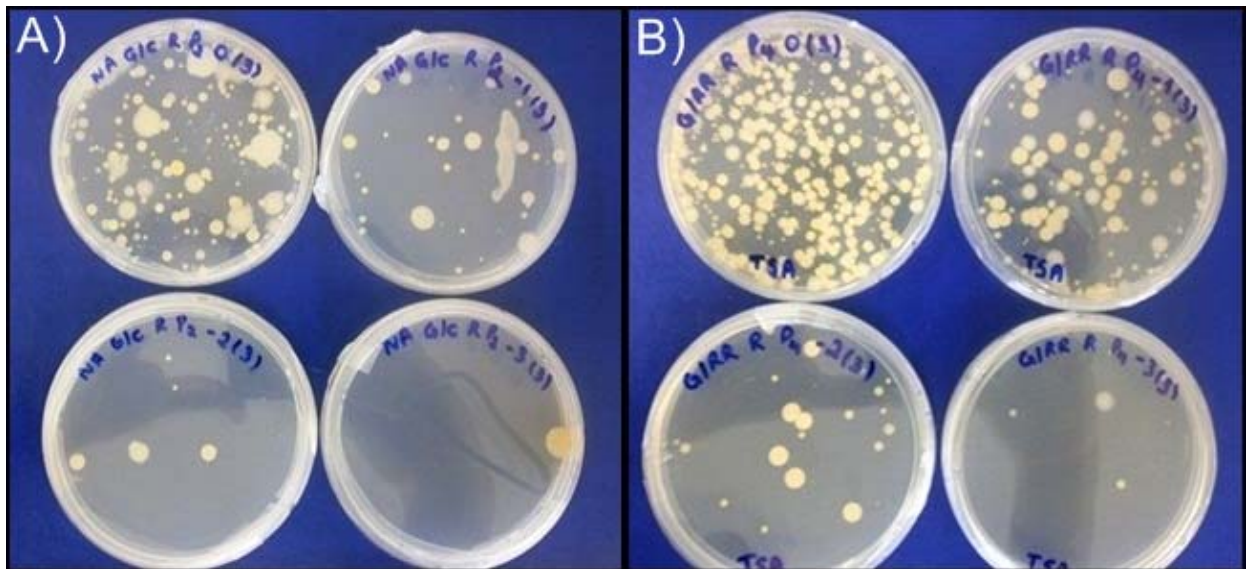
126		GR	R	PG	-	-	-	-	-	-	-	+
127	<i>Rhizobium pusense</i>	GR	R	PG	++	-	+++	-	++	+	-	-
128	<i>Enterobacter ludwigii</i>	GR	R	PG	+	+++	+++	-	+++	+++	-	-
129		GR	C	G	-	++	-	++	-	-	-	++
130	<i>Citrobacter freundii</i>	GR	C	G	-	-	-	-	-	-	-	-
131	<i>Nocardioides alkalitolerans</i>	GR	C	G	+	-	-	-	-	+	+	+
132		GR	C	G	-	+	-	-	-	-	+	+
133		GR	C	G	-	++	-	-	-	-	-	-
134		GR	C	G	-	++	-	-	-	-	-	+
135		GR	R	G	++	-	-	-	-	+	-	++
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>											
136		GR	R	G	+	-	-	-	+	+++	+++	+
137	<i>Kosakonia cowanii</i>	GR	R	G	+	++	-	-	+	+++	+	-
138		GR	R	G	+	++	-	-	+	+++	++	-

AIA-produção de ácido indolacético; Psolub-solubilização de fosfato; EPS-produção de exopolissacarídeos; Sidero-produção de sideróforos; Swarm-Swarming; Swim-Swimming; Prot-produção de protease; Lipase-produção de lipase; Chitin-produção de quitinase.

^a Produção de AIA: -, não (-) ausência de coloração, ou seja, não produção de AIA; (+) leve coloração, pouca produção; (++) média coloração, média produção; (+++) coloração intensa, alta produção de AIA. ^b Solubilização de fosfato, sideróforos, protease, lipase e quitinase: -, (-) ausência de halo, ou ausência de atividade; (+) halo pequeno (1 – 2 mm), pouca atividade; (++) halo médio (2 – 4 mm), atividade mediana; (+++) halo grande (superior a 4 mm), alta atividade. ^c Produção de EPS: (-) ausência de produção de EPS; (+) pouca produção; (++) média produção; (+++) alta produção. ^c Motilidade: (-) ausência de motilidade; (+) pouca motilidade; (++) média motilidade; (+++) alta motilidade.

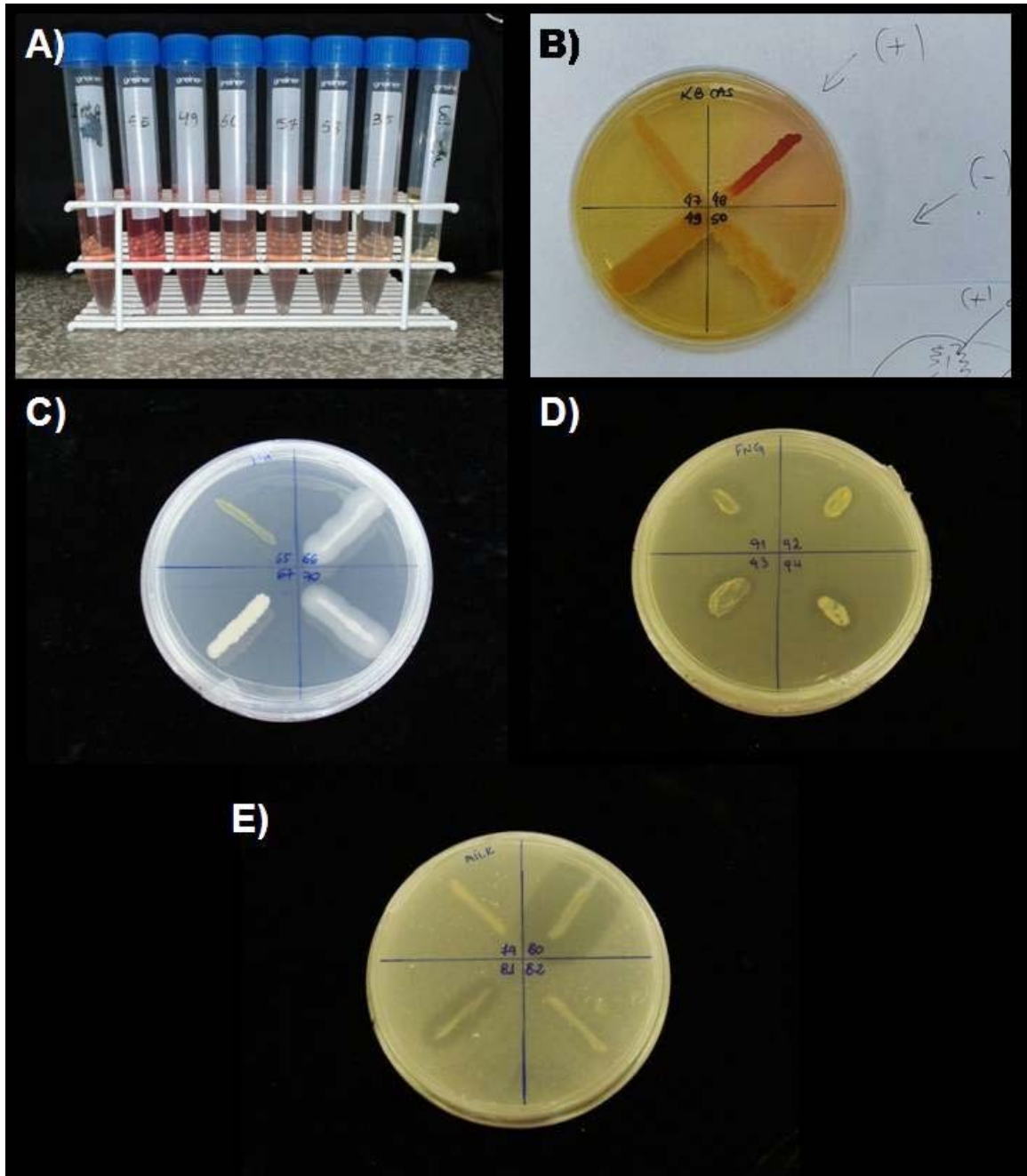
APÊNDICE B

Bactérias endofíticas isoladas de raízes de cultivares de soja A) convencionais e B) transgênicas, obtidas do ensaio no município de Guarapuava/PR.



APÊNDICE C

Caracterização fenotípica de bactérias endofíticas isoladas de soja convencional e transgênica quanto a A) produção de AIA, B) produção de sideróforos, C) produção de EPS, D) solubilização de fosfato inorgânico, E) produção de protease.



APÊNDICE D

Teste de motilidade de bactérias endofíticas isoladas de soja convencional e transgênica quanto a habilidade de A) swarming e B) swimming.

