



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KARITA DOS REIS COSTA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO VEGETAL USANDO MILHO COMO  
PLANTA-ISCA PARA A OBTENÇÃO DE ISOLADOS  
ESPECIALIZADOS**

KARITA DOS REIS COSTA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO  
CRESCIMENTO VEGETAL USANDO MILHO COMO  
PLANTA-ISCA PARA A OBTENÇÃO DE ISOLADOS  
ESPECIALIZADOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira.

Londrina  
2013

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C837i Costa, Karita dos Reis.

Isolamento de bactérias promotoras do crescimento vegetal usando milho como planta-isca para a obtenção de isolados especializados / Karita dos Reis Costa. – Londrina, 2013.

112 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013. Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. Crescimento bacteriano – Teses. 3. Milho – Cultivo – Teses. 4. Nitrogênio – Fixação – Teses. I. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

KARITA DOS REIS COSTA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO  
VEGETAL USANDO MILHO COMO PLANTA-ISCA PARA A  
OBTENÇÃO DE ISOLADOS ESPECIALIZADOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. José Ivo Baldani  
UFRRJ – Seropédica – RJ  
Embrapa Agrobiologia – Seropédica – RJ

---

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira  
UEL – Londrina – PR  
Embrapa Soja – Londrina – PR

Londrina, 09 de Agosto de 2013.

Dedico este trabalho ao meu esposo, alma gêmea de minha alma, que compartilha meus anseios, angústias e alegrias; que me estende sua mão amiga, me afaga e me serena nos momentos difíceis. A você, todo meu amor.

## **AGRADECIMENTOS**

A realização desta dissertação marca uma etapa importante e muito almejada em minha vida, resultado de muito esforço e dedicação. E não poderia deixar de registrar minha sincera gratidão a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para sua concretização.

A Deus, pela oportunidade e pelo privilégio em compartilhar tamanha experiência. Por ter colocado em meu caminho pessoas enormemente sábias e queridas.

Ao meu orientador, Prof André L. M. de Oliveira, que ofereceu-me a oportunidade mais valiosa da minha vida acadêmica. Agradeço pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por saber reconhecer minhas limitações e poder torná-las mais um motivo de superação. Espero ter honrado todo o empenho que depositou em mim.

Ao CNPQ, CAPES, INCT-FBN pelo apoio financeiro dedicado a este estudo.

Ao meu esposo Igor, por todo o companherismo, compreensão, incentivo e carinho que dedica-me dia-a-dia.

À minha mãe e ao meu irmão, pois nem mesmo a distância foi capaz de impedir que eu pudesse sentir toda a energia positiva e o apoio de vocês.

Aos meus amigos de mestrado, pois juntos trilhamos uma etapa importante em nossas vidas. Em especial a Danielle Ferreira, Flávia Debiagi, Karina Milani, Odair Pais e Felipe Nael, aos quais já disse e repito: sem vocês, tudo seria muito mais difícil!

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (UEL), que muito contribuíram para o aprimoramento de meus conhecimentos.

Aos técnicos de laboratório Nelson Janeiro e Silvia Borba, almas esplendorosas, por todo auxílio prestado.

Aos Professores José Ivo Baldani e Marco Antonio Nogueira, por terem participado da minha banca de defesa, certamente com sugestões preciosas; e às Professoras Elisete Rodrigues e Francismar Corrêa por terem integrado a minha banca de qualificação.

Por fim, a todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho. Minha eterna gratidão! Que Deus continue iluminando o caminho de vocês!

*Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.*  
*(Marthin Luther King)*

COSTA, Karita dos Reis. **Isolamento de bactérias promotoras do crescimento vegetal usando milho como planta-isca para a obtenção de isolados especializados**. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

Estudos sobre a diversidade microbiológica associada a plantas saudáveis de milho são de grande relevância para a elucidação da interação microrganismo-planta e por possibilitar a identificação de isolados eficientes na promoção do crescimento de plantas com aplicação potencial no desenvolvimento de insumos biotecnológicos. Bactérias diazotróficas representam um componente importante no suprimento de nitrogênio em diversos ecossistemas, e, além de contribuírem para a fixação biológica do nitrogênio (FBN), promovem o desenvolvimento de plantas a partir da produção de outras substâncias, como o AIA, enzimas líticas, solubilização de fósforo entre outros. O desenvolvimento de uma metodologia específica para o isolamento de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCVs) pode ser alcançado a partir do conhecimento sobre a ecologia deste grupo bacteriano e as estratégias utilizadas para isolar simbiontes altamente eficientes. O conhecimento da diversidade de BPCV em solos sob diferentes tipos de uso pode fornecer indicativos dos melhores sítios de prospecção de isolados-élite, bem como identificar estratégias de manejo que favoreçam a ocorrência deste grupo bacteriano nos solos de cultivo agrícola. Este trabalho experimentou quatro tipos de solos para o isolamento seletivo de bactérias com potencial associativo a plantas de milho, de onde obteve-se 63 isolados diazotróficos e que apresentaram grande diversidade filogenética, com dominância do filo *Proteobacteria*. A estratégia do uso da armadilha fisiológica utilizando o milho como planta-isca foi eficiente para o isolamento de estirpes associativas presentes em populações acima de  $10^6$  células por grama de tecido vegetal. Através desta abordagem, isolados bacterianos compatíveis para a associação com plantas de milho puderam ser obtidos mesmo quando presentes em populações relativamente pequenas em solo nativo. Os isolados obtidos foram caracterizados bioquimicamente quanto à produção de AIA, enzimas líticas, solubilização de fósforo e atividade antagonista, como também quanto à capacidade de promover o desenvolvimento inicial de plantas de milho. Não houve relação entre os parâmetros bioquímicos de cada isolado com o efeito que estes apresentaram sobre o comprimento da raiz principal de milho, porém, foi possível identificar dentre os isolados, aqueles que promoveram efeitos de estimulação e de inibição sobre o desenvolvimento inicial de plantas. Quatro isolados foram selecionados por reunir características desejáveis para a promoção do crescimento vegetal com incrementos significativos na emergência de raiz principal de plântulas de milho: 23AGR2, 11AGR1, 36GRM1 e 48GRM1. Estas estirpes foram isoladas a partir de raízes de milho cultivado em solos com diferentes diluições, caracterizando a eficiência da metodologia de armadilha fisiológica proposta neste trabalho.

**Palavras-chave:** Bactérias promotoras do crescimento vegetal. Armadilha fisiológica. Milho.

COSTA, Karita dos Reis. **Isolation of plant growth promoting bacterias using maize as bait plant for obtaining specialized isolates**. 2013. 112f. Dissertation (Master's Degree on Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

Studies on microbial diversity associated with healthy maize plants are of great importance for the elucidation of plant-microorganism interaction and enable the identification of isolates effective in promoting plant growth with potential applications in the development of biotechnological inputs. Diazotrophics represent an important component in the supply of nitrogen in many ecosystems, and, besides contributing to the biological nitrogen fixation (BNF), promote the development of plants from the production of other substances, such as IAA, enzymes lytic solubilization phosphate among others. The development of a specific methodology for the isolation of plant growth promoting bacteria (PGPBs) can be reached from the knowledge about the ecology of this bacterial group and the strategies used to isolate highly efficient symbionts. Knowledge of the diversity of PGPB in soils under different types of use can provide indicative of best prospecting sites of elite isolated, and identify management strategies that favor the occurrence of this bacterial group in farmlands. This work assessed four types of soils for selective isolation of bacteria with potential association with maize plant, where we obtained 63 isolates diazotrophics and showed great phylogenetic diversity with dominance of the phylum *Proteobacteria*. The strategy of using the physiological trap plant using maize as bait was effective for the isolation of strains present in associative populations above  $10^6$  cells per gram of plant tissue. Through this approach, bacterial isolates for association with compatible maize plants could be obtained even when present in relatively small populations in the native soil. The isolates were characterized biochemically for IAA production, lytic enzymes, phosphate solubilizing and antagonistic activity, as well as the ability to promote the early development of maize plants. There was no relationship between the biochemical parameters of each isolate the effect they had on the main root length of maize, however, were identified among the isolates, those who promoted effects of stimulation and inhibition on the early development of plants. Four isolates were selected for desirable characteristics together to promote plant growth with significant increases in the emergence of the primary root of maize seedlings: 23AGR2, 11AGR1, 36GRM1 and 48GRM1. These strains were isolated from maize roots grown on soils with different dilutions, characterizing the efficiency of the methodology proposed in this paper physiological trap.

**Key words:** Plant growth promoting bacterias. Physiological trap. Maize.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Principais países produtores de milho em 2010.....	22
<b>Figura 2</b> – Tipos de endofíticos e seu processo de colonização de raízes.....	25
<b>Figura 3</b> – Amostragem dos solos avaliados.....	38
<b>Figura 4</b> – Identificação dos isolados obtidos a partir da metodologia de armadilha fisiológica ao nível de filo. Solos avaliados (Agrícola 1, Agrícola 2, Gramado e Floresta) conforme a Tabela 1 .....	53
<b>Figura 5</b> – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho cultivado no solo agrícola 1 em nível de Ordem .....	56
<b>Figura 6</b> – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho cultivado no solo agrícola 2 (área de pousio) em nível de Ordem.....	57
<b>Figura 7</b> – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho cultivado no solo de gramado em nível de Ordem .....	57
<b>Figura 8</b> – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho cultivado no com solo de floresta em nível de Ordem .....	58
<b>Figura 9</b> – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo agrícola1.....	61
<b>Figura 10</b> – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo agrícola2 .....	63
<b>Figura 11</b> – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo de gramado .....	64
<b>Figura 12</b> – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo de floresta .....	65
<b>Figura 13</b> – Distribuição dos isolados obtidos a partir da metodologia de armadilha fisiológica, quanto à atividade proteolítica.....	70
<b>Figura 14</b> – Distribuição dos isolados obtidos a partir da metodologia de armadilha fisiológica classificados arbitrariamente como de alto potencial para a solubilização de fosfatos.....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Croqui do experimento. Cada tratamento foi realizado para o isolamento de bactérias associativas em cultivares de milho em cinco repetições .....	37
<b>Tabela 2</b> – Características químicas dos solos experimentais (0-10cm).....	39
<b>Tabela 3</b> – Meios de cultivo seletivos livres de nitrogênio direcionados para o isolamento de bactérias diazotróficas comumente encontradas em tecidos vegetais de gramíneas e respectivos grupos-alvo (ANEXO D).....	41
<b>Tabela 4</b> – Número de isolados diazotróficos obtidos de raízes de milho híbrido AG 2040 (Monsanto) sob diferentes tipos e diluições de solos, e meios de cultura seletivos .....	49
<b>Tabela 5</b> – Análise de diversidade dos isolados diazotróficos entre os tipos de solos avaliados neste estudo .....	55
<b>Tabela 6</b> – Análise de diversidade dos isolados diazotróficos entre os tratamentos experimentados .....	55
<b>Tabela 7</b> – Distribuição dos isolados encontrados em tratamentos com solos diluídos (ao nível de Ordem) que não foram isolados em solo sem diluição .....	59
<b>Tabela 8</b> – Perfil bioquímico dos isolados e padrões exibindo a produção de auxinas (aux/ptn), de enzimas líticas (amilase, celulase e protease), solubilização de fosfatos e atividade antagonista ao fungo <i>Fusarium</i> sp pelo somatório dos valores arbitrários atribuídos às análises.....	67
<b>Tabela 9</b> – Isolados de produção de AIA equivalente aos padrões .....	68
<b>Tabela 10</b> – Média do comprimento da raiz principal de sementes de milho germinadas em 3 dias, submetidas à inoculação pelas 63 estirpes isoladas, pelas estirpes padrões e pelo tratamento controle .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido-3-indol-acético
Al	Alumínio
BPCV	Bactérias promotoras do crescimento vegetal
Ca	Cálcio
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloreto de cálcio diidratado
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pnta-hidratado
cm	Centímetro
cmol/dm <sup>3</sup>	centimol de carga por decímetro cúbico
CMC	Carboximetilcelulose
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EXO I	Exonuclease I
Fe <sup>3+</sup>	Ferro
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de ferro hexa-hidratado
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Citrato de ferro
Fe-EDTA	Ferro-EDTA
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
g	Gramma
H'	Índice de Shannon-Wiener
ha	Hectare
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico
H <sub>3</sub> MoO <sub>4</sub>	Ácido molíbdico
IE	Ídice enzimático
K	Potássio
Kg	Kilograma
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
KOH	Hidróxido de potássio
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de potássio

Km <sup>2</sup>	Kilômetro quadrado
L	Litro
m	Metro
M	Molar
Mg	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
m/z	Massa/carga
MM	Meio mínimo
MO	Matéria orgânica
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato magnésio heptahidratado
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganês monohidratado
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganês tetra hidratado
N	Nitrogênio
N <sub>2</sub>	Nitrogênio atmosférico
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amônio
NO <sup>-2</sup>	Nitrito
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sódio diidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
NFb	Novo Fábio Pedrosa
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amônio
Nm	Nanômetro
OTU	Unidade taxonômica operacional
P	Fósforo
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGPR	Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
PVP	Polivinilpirolidona
pH	Potencial hidrogeniônico

pmol	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rep-PCR	<i>Repetitive Sequence Based</i> PCR
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
TBE	Tris-EDTA ácido bórico
t	Tonelada
U	Unidade
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
v/v	volume/volume
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinco hepta-hidratado
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
3.1	A CULTURA DO MILHO .....	21
3.2	BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCVs).....	23
3.3	DIVERSIDADE DE BPCVs ASSOCIADAS ÀS GRAMÍNEAS .....	27
3.4	SELEÇÃO DE BPCVs PARA USO NA AGRICULTURA .....	29
3.4.1	Plantas-isca e Estratégia de Isolamento .....	32
3.4.2	Caracterização Bioquímica dos Isolados.....	33
3.4.3	Caracterização Molecular dos Isolados .....	35
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	37
4.1	ARMADILHA FISIOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS .....	37
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	39
4.3	ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS .....	40
4.4	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS .....	41
4.4.1	Extração do DNA Genômico.....	41
4.4.2	Amplificação do DNA Genômico pela Técnica de Rep-PCR Utilizando o Oligonucleotídeo Iniciador BOX.....	42
4.4.3	Sequenciamento.....	43
4.4.3.1	Amplificação do gene 16S RNAr por PCR.....	43
4.4.3.2	Purificação e qualificação dos produtos de amplificação .....	44
4.4.3.3	Reação de sequenciamento.....	44
4.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS .....	45
4.5.1	Produção de Compostos Indólicos (Auxinas).....	45
4.5.1.1	Determinação de proteínas .....	45
4.5.2	Solubilização de Fosfatos.....	46
4.5.3	Determinação de Enzimas Líticas .....	46

4.5.4	Atividade Antifúngica .....	46
4.6	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
5.1	ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS RAÍZES DE PLANTAS DE MILHO.....	48
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	53
5.2.1	Análise da Diversidade Bacteriana por BOX-PCR .....	61
5.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS .....	65
5.4	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS.....	73
5.5	SELEÇÃO DOS ISOLADOS PROMISSORES PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA .....	75
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE A</b>	– Plantio das Sementes de Milho Germinadas nos Tratamentos Pré-definidos.....	97
<b>APÊNDICE B</b>	– Germinação de Sementes de Milho Desinfectadas em Papel Filtro e Água Destilada Estéril.....	98
<b>APÊNDICE C</b>	– Meios Semi-seletivos LGI e NFb com Formação de Película Característica de Inoculação com Diazotrófico após 7 Dias de Incubação .....	99
<b>APÊNDICE D</b>	– Cultura em Meio NFb, JMV e JNFb Sólidos para Verificação da Pureza das Estirpes Isoladas.....	100
<b>APÊNDICE E</b>	– Gel de BOX-PCR.....	101
<b>APÊNDICE F</b>	– Quantificação da Produção de AIA por Turbidimetria .....	102
<b>APÊNDICE G</b>	– Determinação das Enzimas Líticas Amilase, Celulase e Protease pelos Isolados Bacterianos.....	103
<b>APÊNDICE H</b>	– Germinação de Sementes de Milho Inoculadas .....	104

<b>APÊNDICE I –</b>	Caracterização Filogenética e Bioquímica dos Isolados com Ênfase no Potencial Promotor de Crescimento e sua Possível Aplicação Biotecnológica.....	105
<b>ANEXO</b>	.....	107
<b>ANEXO A –</b>	Meio Dygs (RODRIGUES NETO, 1986).....	108
<b>ANEXO B –</b>	Solução Nutritiva de Adubação para Vasos (KAWAMITSU et al., 1999).....	109
<b>ANEXO C –</b>	Solução Salina para Diluição Seriada (BALDANI, 1980) .....	110
<b>ANEXO D –</b>	Meios de Cultivo Semi-Seletivos.....	111

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) representa um dos cereais mais cultivados no mundo, estando diretamente associado à alimentação humana e animal (FAO, 2013). Na agricultura brasileira, apresenta grande relevância socioeconômica por ser uma *commodity* em ascensão no mercado internacional e possuir extensa cadeia produtiva, sendo peça fundamental na composição do sistema de rotação de culturas (BONO et al., 2008).

No Brasil, terceiro maior produtor mundial de milho, a produção nacional totalizou 72 milhões de toneladas (t) em 2012, correspondendo a 40 % da produção de grãos. O estado do Paraná liderou a produção desse cereal com participação de 23 % da produção nacional (CONAB, 2013).

Um dos mais altos custos da agricultura está relacionado com o uso de fertilizantes nitrogenados. Cerca de 78 % da atmosfera terrestre é composta pelo gás dinitrogênio e a introdução deste, via fixação biológica de nitrogênio (FBN), no circuito dos ciclos biogeoquímicos tem efeitos positivos no ambiente e na economia (STACEY et al., 1992). O fator essencial para a agricultura sustentável é o eficiente aproveitamento do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), o que garante elevadas produções na agricultura tropical (GRAHAM; VANCE, 2000). A presença da tripla ligação no gás dinitrogênio o torna extremamente estável em temperatura ambiente, impossibilitando sua absorção e assimilação pela maioria dos organismos (SPRENT; SPRENT, 1990; EVANS; BURRIS, 1992). É necessário que esse nitrogênio esteja disponível em uma forma mais reduzida, como amônio ( $NH_4^+$ ) ou  $NO_3^-$  (Nitrato), para que possa ser utilizado na biossíntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormônios e outros compostos nitrogenados (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os diazotróficos formam um seleto grupo de microrganismos procariotos capazes de converter o nitrogênio gás em amônio, forma pela qual pode ser assimilada pelos vegetais. A importância da fixação biológica do nitrogênio (FBN) para a agricultura brasileira é refletida pela sua inserção dentro do Programa Agricultura de Baixo Carbono (programa ABC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como também pela criação do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica do Nitrogênio (INCT-FBN) pelo CNPq.

Evans e Burris (1992) sugerem que as bactérias fixadoras de nitrogênio sejam divididas em 3 grupos: diazotróficas de vida livre, que fixam o

nitrogênio para seu próprio uso; diazotróficas associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose, e as diazotróficas simbióticas, que estabelecem uma interação estreita entre o macro e microssimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

A simbiose rizóbio-leguminosa é a interação mais estudada (EVANS; BURRIS, 1992; STRALIOTO, 2005), entretanto, algumas plantas da família Poaceae têm mostrado capacidade de receber contribuições significativas da FBN para sua nutrição, como por exemplo a cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz (REIS et al., 2006). A relação das bactérias diazotróficas com plantas da família Poaceae pode ser considerada não simbiótica, ou associativa, uma vez que não se observam estruturas vegetais especializadas para abrigar tais microrganismos (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

De acordo com Hungria e colaboradores (2001), são 4 as fontes de fornecimento de nitrogênio aos vegetais: 1. o solo, principalmente pelo processo de mineralização de matéria orgânica; 2. a fixação não-biológica, resultante das descargas elétricas, combustão e vulcanismo; 3. os fertilizantes nitrogenados; 4. o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico.

Em termos globais, estima-se que o processo biológico de fixação do nitrogênio contribua com 65% do nitrogênio total assimilado anualmente pelos seres vivos, sendo a FNB o maior provedor desse nutriente para a manutenção da vida na Terra. Cerca de 10 % da entrada anual deve-se à fixação não-biológica e 25 % através da produção industrial da amônia (HUNGRIA et al., 2001).

Práticas agrícolas alternativas como a aplicação racional e fracionada de fertilizantes nitrogenados e práticas que explorem eficazmente o mecanismo natural da FBN devem ser desenvolvidas e difundidas, visando diminuir custos agrícolas e garantir a sustentabilidade da agricultura ao longo prazo.

No Brasil, inoculantes comerciais para milho à base de cepas de *Azospirillum brasilense* de alta eficiência já estão disponíveis no mercado e apresentam efeitos significativos no incremento da produção (HUNGRIA et al., 2010). Entretanto, não existem estratégias para a prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCVs) para culturas não-leguminosas que sejam direcionados a obtenção de isolados especializados. O isolamento de bactérias de BPCVs é feito a partir de abordagens generalistas, através do

levantamento da diversidade microbiana associada às plantas coletadas nas mais diferentes condições. Este trabalho resulta da necessidade do fortalecimento da agricultura sustentável, buscando uma metodologia de alta eficiência para ampliar o número de estirpes inoculantes registradas no Brasil para uso como inoculantes em plantas não-leguminosas. A abordagem apresentada neste trabalho considera o solo como repositório da diversidade microbiana, cuja comunidade nativa inclui uma gama de BPCVs diferenciadas quanto às funções ecológicas e quanto à capacidade de interagir positivamente com espécies vegetais de interesse agrônomo. Através da adaptação e otimização de metodologia aplicada ao isolamento de rizóbios, espera-se contribuir para o desenvolvimento de uma metodologia específica para a obtenção de BPCVs de elevada compatibilidade e eficiência, e que possa ser aplicada às mais diferentes espécies vegetais.

## 2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia para selecionar BPCVs compatíveis para a associação com milho por meio do uso de plantas-isca, e caracterizar a diversidade dos isolados obtidos.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a estratégia de armadilha fisiológica (planta-isca) para o isolamento de BPCVs associativas com plantas não-leguminosas;
- Posicionar taxonomicamente as estirpes isoladas pelo seqüenciamento do gene 16S RNAr;
- Comparar a diversidade de BPCVs nativas de diferentes tipos de solo e entre os diferentes tratamentos, utilizando o marcador molecular BOX-A1R;
- Caracterizar, através de métodos bioquímicos (FBN, determinação de auxina, solubilização de fosfatos, atividade antagonista ao fungo *Fusarium* sp e produção de enzimas líticas – amilase, celulase e protease), os microrganismos isolados quanto ao potencial de promoção do crescimento vegetal;
- Realizar uma caracterização preliminar dos isolados obtidos quanto ao potencial para uso como inoculante agrícola através de ensaios de germinação em sementes de milho, e buscar correlação entre os parâmetros bioquímicos dos isolados com o efeito observado nos testes de germinação.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) constitui um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutricional. A importância econômica do milho é caracterizada pela sua multiplicidade de aplicações, abrangendo desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, assumindo relevante papel socioeconômico (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

O milho, pertencente à família das Poaceae, gênero *Zea*, cientificamente denominado *Zea mays* L. (VIEIRA JÚNIOR, 1999), é uma das culturas mais antigas do mundo, havendo provas arqueológicas, de seu cultivo há mais de 4.000 anos. Sua origem ainda não está esclarecida (TAVARES, 1988), sendo relatada em alguns estudos como originária da América do Norte (México) e em outros, originária da Ásia.

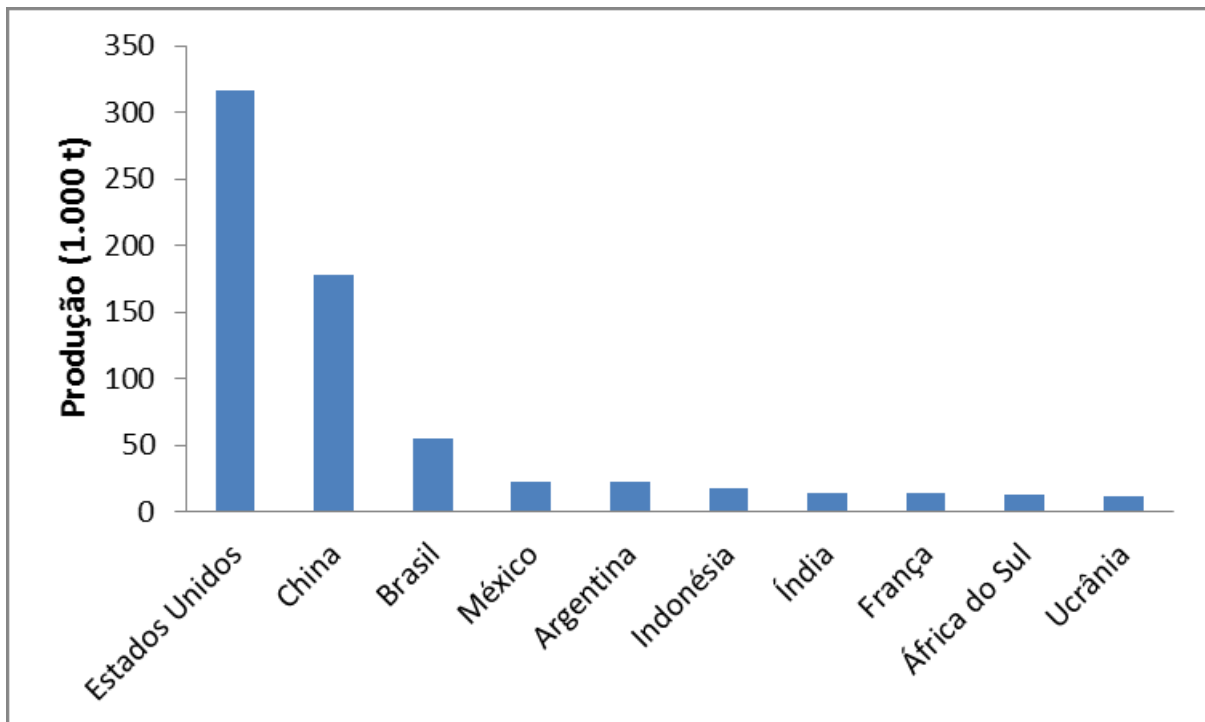
Para se desenvolver e produzir satisfatoriamente, a cultura do milho exige, durante seu ciclo vegetativo, calor e umidade, o que garante altos índices de produtividade ao Brasil (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004). O cultivo de milho em nosso país, de maneira geral, tem sido realizado em duas épocas de plantio. Os cultivos de verão, ou primeira safra, a semeadura é realizada entre os meses de setembro e novembro, em função do início da estação chuvosa. No Norte e Nordeste, o período propício para a semeadura compreende os meses de março e abril. A segunda safra, ou safrinha, é implantada em épocas não tradicionais, normalmente de janeiro a abril, em decorrência do final do ciclo da soja nos estados do Centro-Oeste, Paraná e São Paulo, principalmente (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2010; FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

A produção de milho em 2012 foi de aproximadamente 72,2 milhões de toneladas o que correspondeu a 40 % da produção nacional de grãos (180,4 milhões t). A cadeia produtiva do milho é um dos segmentos econômicos mais importantes do agronegócio brasileiro, especialmente para o estado do Paraná, que liderou a produção do grão na safra 2012/2013, com 16,9 milhões (t) (CONAB, 2013). Além de se destacar pelo alto nível de produtividade, fruto do incremento

tecnológico registrado na região, o Paraná é o estado que mais se beneficia com as exportações em virtude da sua estrutura portuária (PINAZZA et al., 2007).

Dentro da evolução mundial de produção de milho, o Brasil tem se destacado como o terceiro maior produtor, ficando atrás dos Estados Unidos e da China. Apesar de estar entre os maiores produtores, o Brasil não apresenta grandes níveis de produtividade, fato que pode ser explicado pela má organização da cadeia produtiva em função de uma grande parcela de pequenos produtores (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2010). Na Figura 1 pode-se observar a produção dos dez maiores produtores de milho do mundo no ano de 2010.

**Figura 1** – Principais países produtores de milho em 2010.



Fonte: Fao (2013).

A produção brasileira de milho está projetada para crescer 1,7 % a.a. nos próximos dez anos e a área plantada deverá aumentar 0,4 %. As previsões indicam ainda que, nos próximos anos, cerca de 84 % da produção de milho será destinada ao mercado interno, para o atendimento do consumo humano e fabricação de rações para animais, em especial suínos e aves (MAPA, 2012).

Em comparação com outras culturas, o milho tem experimentado avanços significativos nas diversas áreas do conhecimento agrônomo, estabelecendo-se uma melhor compreensão de suas relações com o meio e o

homem. Tais interações mostram-se fundamentais para o entendimento do sistema produtivo e da melhoria dos sistemas tecnológicos (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

Quanto às características nutricionais, o nutriente mais exigido pela cultura do milho é o nitrogênio (N) (MALAVOLTA et al., 1997). A adubação química otimiza o potencial produtivo, uma vez que a maioria dos solos brasileiros apresenta baixa fertilidade natural (CANTARELLA; DUARTE, 2004). A demanda do nitrogênio aplicado à cultura do milho tem aumentado principalmente devido ao melhoramento genético dos cultivares que, por seu potencial produtivo, tornaram-se mais exigentes (MATSON et al., 1998). Este elemento, fornecido à cultura via adubação sintética, possui baixo índice de aproveitamento pelas plantas, raramente ultrapassando 50 % (HUNGRIA et al., 2007). Entretanto, quando em déficit na planta, esse nutriente se torna o principal fator limitante para o crescimento vegetal, reduzindo a produtividade (DURÃES et al., 2004). Como o nitrogênio é o nutriente requerido em maiores quantidades pela cultura do milho e sua deficiência é generalizada nos solos tropicais, o processo da FBN deve ser otimizado para que se torne a principal fonte de nitrogênio na agricultura orgânica e sustentável (CRUZ et al., 2006).

A busca por microrganismos do tipo fixadores de nitrogênio é de grande interesse dentro deste contexto. Relatos da associação de bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Acinotobacter*, *Artrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Xantomonas* são os mais frequentes em estudos da interação de diazotróficos com plantas de milho (ARRUDA et al., 2013; BALDANI; DÖBEREINER, 1980; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; GOMES et al., 2001; IKEDA et al., 2013; 2001; LIU et al., 2012; LIU et al., 2013; MARQUES et al., 2010; PALUS et al., 1996; PEREIRA et al., 2011; PERIN et al., 2006; ROESCH et al., 2008; SALA et al., 2005).

### 3.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCVs)

Em 1926, Perotti formulou a teoria de que bactérias não patogênicas residem em tecidos de plantas, porém, estudos sobre a colonização de tecidos internos de plantas sadias datam de 1870, com trabalhos de Pasteur e outros pesquisadores (HALLMANN et al., 1997). Em ecossistemas naturais ou de manejo,

bactérias benéficas associadas às raízes de plantas desempenham um papel fundamental no apoio à saúde das mesmas e até mesmo estimulando o seu desenvolvimento (COMPANT et al., 2012).

Interações benéficas entre plantas e microrganismos que promovem a saúde e o desenvolvimento dos vegetais têm sido objeto de muitos estudos. No entanto, poucas plantas foram completamente estudadas em relação à sua biologia endofítica. Conseqüentemente, a oportunidade de se encontrar novos microrganismos benéficos em associação com a grande diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas é considerável (RYAN et al., 2008).

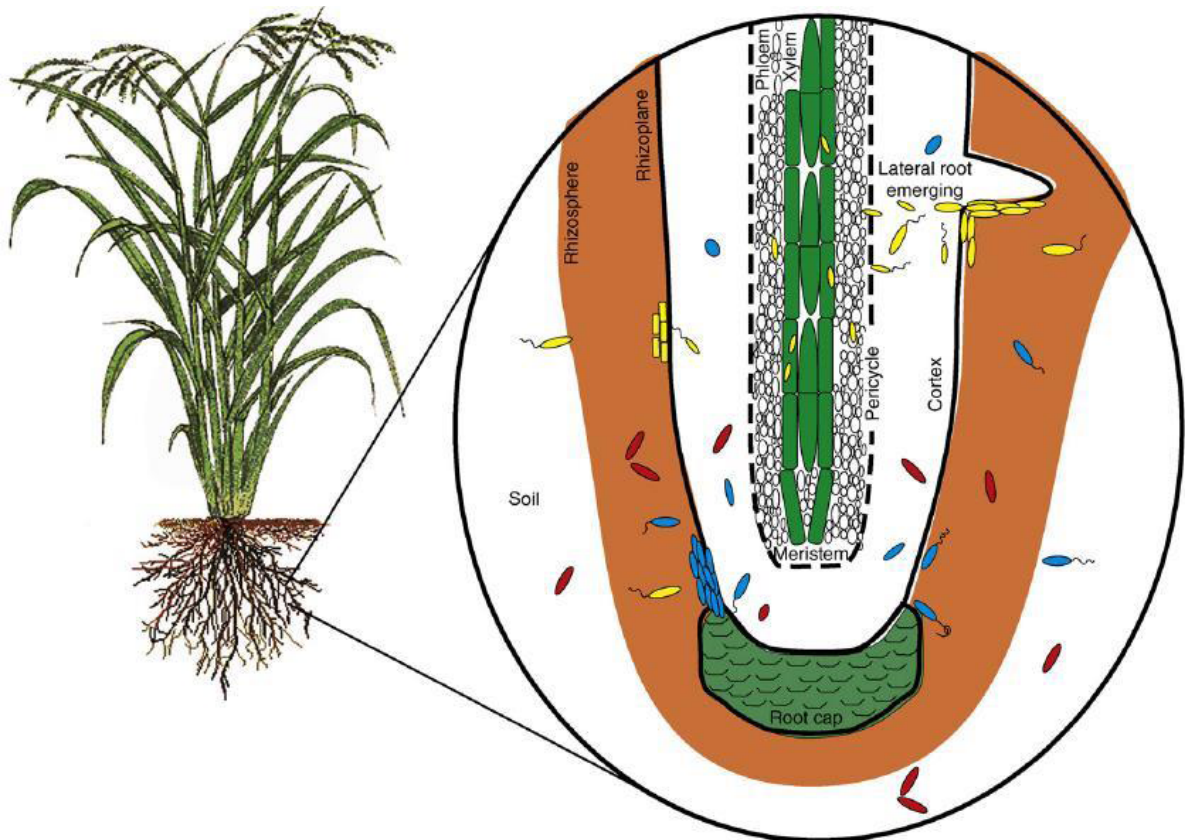
As bactérias promotoras do crescimento vegetal têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento de plantas por mecanismos diretos como a fixação biológica de nitrogênio, produção de reguladores de crescimento vegetal (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico) e solubilização de fosfatos inorgânicos; e mecanismos indiretos, como o controle biológico de pragas, produção de sideróforos, proteção contra stress biótico e abiótico e indução de resistência local e sistêmica (LODEWYCKX et al., 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; OLIVARES, 2009; SINGH et al., 2011). Mais recentemente foi descrita a ação de BPCV atuando na biorremediação de águas e solos contaminados, mineralizando poluentes orgânicos (BASHAN; BASHAN, 2005; BASHAN et al., 2011; JALGAONWALA; MAHAJAN, 2011; ZHUANG et al., 2007).

Pesquisas demonstram que bactérias endofíticas podem promover o crescimento de plantas e reduzir os sintomas de doenças causadas por diversos patógenos, além de serem fontes potenciais para uso em biotecnologia com a produção de antibióticos e outras moléculas bioativas, nos processos de biorremediação e nas técnicas de transgenia (COMPANT et al., 2010; GLICK, 2012; HALLMANN et al., 1997; OLIVARES, 2009). Esta comunidade endofítica é constituída por fungos e bactérias que, durante todo ou parte do seu ciclo de vida, podem invadir tecidos de plantas vivas através de infecções não aparentes e sem causar sintomas de doenças (BODDEY; DÖBEREINER, 1995; JAMES, 2000; PARTIDA-MARTÍNEZ; HEIL, 2011; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; RYAN et al., 2008).

Os microrganismos que infectam e colonizam plantas originam-se, geralmente, a partir do solo. A principal porta de entrada para a colonização bacteriana é através das fissuras de raiz (Figura 2), mas podem acontecer também

por feridas causadas por fitopatógenos microbianos, nematoides e tratos culturais, ou pelos estômatos (HARDOIM et al., 2008; MCCULLY, 2001). Ainda há indícios de que raízes laterais não completamente diferenciadas podem facilitar a penetração de microrganismos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Contudo, sabe-se que as raízes das plantas secretam íons, enzimas, mucilagem, compostos de carbono derivados do metabolismo primário e secundário, e que são ativos na atração de microrganismos do solo, sendo responsáveis por selecionar a microbiota rizosférica. Essa rizodeposição promove efeito seletivo sobre as populações microbianas específicas que são capazes de reagir em resposta com a quimiotaxia e o crescimento rápido, de modo que apenas um subconjunto de toda a diversidade microbiana do solo colonize as raízes com sucesso (HARTMANN et al., 2009).

**Figura 2** –Tipos de endofíticos e seu processo de colonização de raízes.



Células vermelhas: bactérias consideradas endofíticas transientes - são, muitas vezes, restritas à raiz e ao córtex; células azuis: consideradas endofíticos oportunistas que apresentam características particulares de colonização da raiz (por exemplo, uma resposta quimiotática), que lhes permite colonizar o rizoplane e depois invadir os tecidos internos da planta através de fissuras formadas nas raízes. No entanto, como ocorre com os endofíticos transientes, endofíticos oportunistas estão confinados ao córtex da raiz; células amarelas: bactérias endofíticas competentes – estão bem adaptadas ao ambiente da planta e são capazes de invadir tecidos específicos como o tecido vascular, disseminando-se por toda a planta, manipulando o metabolismo da mesma e mantendo um equilíbrio harmonioso com a planta hospedeira, mesmo quando estão presentes em grandes concentrações celulares (HARDOIM et al., 2008).

Fatores ambientais bióticos e abióticos podem influenciar o complexo mecanismo de promoção de crescimento vegetal por bactérias (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; COMPANT et al., 2010). Dentre esses fatores, destacam-se: temperatura, umidade, composição e a atividade da microbiota nativa do solo (STRIGUL; KRAVCHENKO, 2006).

Frequentemente, quando se aborda a promoção do crescimento vegetal por bactérias, o grupo *Rhizobiaceae* é o primeiro a ser citado e um dos mais explorados (BASHAN; BASHAN, 2005). As PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* - Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas) constituem um grupo diversificado de bactérias colonizadoras da rizosfera e/ou colonizadoras do ambiente endofítico que, quando cultivadas em associação com plantas, estimulam seu crescimento (AHMAD; KIBRET, 2013; BANCHIO, 2008; VESSEY, 2003). Entretanto, BPCVs também têm sido estudadas, em menor grau, em partes aéreas de plantas (BASHAN; BASHAN, 2005).

Uma variedade de bactérias pode ser considerada BPCVs, incluindo espécies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, assim como as bactérias diazotróficas endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp.* e *Burkholderia* (AHMAD, 2006; HAYAT et al., 2010). Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* pertencem aos grupos das BPCV mais estudados que, além de promoverem crescimento, atuam como agentes no controle biológico de várias pragas e doenças (MISKO; GERMIDA, 2002; AHMAD et al., 2006). As bactérias que apresentam mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal como, por exemplo, fixar nitrogênio e solubilizar fosfatos ou produzir auxina e sideróforos, entre outras, são almejadas e rastreadas para uma possível aplicação no campo, objetivando o aumento da produção agrícola (VERMA et al., 2001).

Segundo Olivares (2009), a utilização de BPCVs no campo depende do conhecimento sobre sua diversidade, os mecanismos de interação bactéria-planta e da habilidade de manter, manipular e modificar populações benéficas sob condições de campo. Diante disso, o desenvolvimento biotecnológico assume papel estratégico na construção de modelos alternativos de produção agrícola visando à agricultura sustentável. Duas estratégias são usadas a favor da produção vegetal: a primeira baseia-se na ativação de comunidades microbianas nativas pelo manejo do solo e do ambiente; uma segunda abordagem fundamenta-se no isolamento e

reinoculação de microrganismos alvos em ensaios experimentais de seleção de estirpes.

A inoculação de bactérias benéficas no sistema de produção da agricultura diminui o uso de insumos químicos como fertilizantes e pesticidas (BRUSSAARD et al., 2007; COCKING, 2003; HAYAT et al., 2010; JALGAONWALA; MAHAJAN et al., 2011). Fica claro, portanto, que as BPCVs representam uma parcela funcionalmente ativa da biota do solo presente na rizosfera, no rizoplane e no interior da planta hospedeira e suas potencialidades são apontadas como componente do manejo sustentável dos sistemas agrícolas.

Singh e colaboradores (2011) relatam que, atualmente, a produção agrícola passa por uma fase de transformação fundamental em todo mundo. No passado, o principal objetivo era aumentar o potencial de rendimento das culturas alimentares e sua produtividade. Hoje, esse desejo é combinado com a demanda para a sustentabilidade. A agricultura sustentável envolve gestão bem sucedida dos recursos agrícolas para satisfazer as necessidades humanas mantendo a qualidade ambiental e conservando as riquezas naturais para o futuro.

### 3.3 DIVERSIDADE DE BPCVs ASSOCIADAS ÀS GRAMÍNEAS

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (COMPANT et al., 2010).

Apesar de sua importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza. O conhecimento sobre a estrutura e a função dos microrganismos associados às plantas agrícolas tropicais ainda é incipiente. Essa limitação se deve, em parte, às dificuldades metodológicas na identificação dos microrganismos e da incapacidade de se isolar populações representativas. Dados derivados de estudos comparativos mostraram que apenas uma pequena parcela dos microrganismos (menor que 10 % dependendo do habitat) é cultivada através do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN et al., 1995; KADEN et al., 2012).

Um grande número de organismos tem sido identificado pelo uso de técnicas moleculares, o que permite o reconhecimento de organismos não culturáveis (DAHLLÖF, 2002; HIRSCH et al., 2010; PROSSER, 2002). Entretanto, a técnica dependente de cultivo ainda é a principal escolha quando se visa à aplicação biotecnológica dos microrganismos isolados. O uso de meios seletivos para o isolamento apresenta a vantagem de direcionar os trabalhos de isolamento para a obtenção de grupos microbianos específicos, como os diazotróficos, já que a utilização de meios de cultivo genéricos pode levar ao isolamento de cepas que possuem crescimento rápido em resposta à disponibilidade nutricional, ou cepas presentes em altas populações na amostra estudada, e que podem inibir o crescimento de outros microrganismos em culturas mistas (HANDLEY et al., 1998).

A diversidade bacteriana associada com raízes de milho foi investigada por Pereira e colaboradores (2011) através de métodos dependentes e independentes de cultivo. A análise molecular, por meio da amplificação da região ITS do DNAr, revelou que os gêneros *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, pertencentes ao grupo  $\gamma$ -*Proteobactéria*, foram predominantes. A comunidade bacteriana cultivável apresentou dominância do grupo *Firmicutes*, principalmente do gênero *Bacillus*.

A atividade microbiológica que ocorre na rizosfera de diversos vegetais de importância econômica é de grande interesse. Em 2010, Marques e colaboradores isolaram seis estirpes de raízes de milho que apresentaram características para a promoção do crescimento vegetal: *Chryseobacterium palustre*, *C. humi*, *Sphingobacterium*, *Bacillus*, *Achromobacter* e *Ralstonia*. Todos os isolados produziram ácido indol-acético *in vitro* e as estirpes *C. humi*, *Sphingobacterium* e *Ralstonia* apresentaram produção de sideróforos.

Estudos de diversidade de BPCV em gramíneas estão bastante direcionados aos organismos fixadores de nitrogênio (OLIVARES et al., 1996). Pesquisas relacionadas com a fixação biológica do nitrogênio (FBN) no Brasil iniciaram-se na década de 50 por Johanna Döbereiner, especialmente em plantas não-leguminosas (BALDANI; BALDANI, 2005). Gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho e algumas forrageiras foram identificadas com hospedeiros de diversas espécies de bactérias diazotróficas, sendo as principais *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum*

*spp* e *Azospirillum spp* (BALDANI et al., 1997; BANO et al., 2013; BODDEY et al., 2003; ILYAS et al., 2012; JAMES, 2000; JAMES; OLIVARES, 1997).

A diversidade de bactérias endofíticas em colmo de milho foi determinada em experimentos conduzidos em casa de vegetação e também em campo por Rai e colaboradores (2007) em diferentes estágios de crescimento. Os resultados encontrados no experimento conduzido em casa de vegetação foram similares aos de campo, porém com decréscimo na contagem populacional. Segundo os autores, isto pode ser atribuído ao fato de que a infecção por bactérias endofíticas é controlada pela planta em condições ambientais, além do que fatores bióticos e abióticos podem influenciar a colonização dessas bactérias no tecido vegetal. *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. fluorescens* foram as espécies predominantemente encontradas nas amostras.

Na rizosfera e no rizoplane de canola encontrou-se elevada abundância dos endofíticos *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* (FARINA et al., 2012). Estirpes de *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Curtobacterium* foram isoladas de plantas de trigo (STETS et al., 2013). Da cana-de-açúcar foram isolados representantes diazotróficos como *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Brevibacillus sp*, *Burkholderia sp*, *Citrobacter sp*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, *Enterobacter sp*, *Erwinia sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas sp* e mais recentemente um isolado relacionado à *Pantoea sp* (BALDANI et al., 1986; BENEDUZI et al., 2013; CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; DONG et al., 1994; LOIRET, 2004; MAGNANI et al., 2010).

### 3.4 SELEÇÃO DE BPCVs PARA USO NA AGRICULTURA

A triagem e a seleção de BPCVs eficientes e sua utilização em práticas integradas é de grande importância para melhorar o crescimento e a produtividade dos sistemas agrícolas, visando manter a sustentabilidade dos agroecossistemas (RANA et al., 2011). Os princípios básicos que orientam a seleção de BPCVs devem objetivar a identificação de estirpes eficientes adaptadas às condições prevalentes no local de emprego e competitivas frente à comunidade nativa.

Uma análise histórica dos estudos sobre interação planta/bactéria em gramíneas, especialmente os cereais, demonstram avanços significativos nos aspectos ecológicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos (BALDANI; BALDANI, 2005). Ainda que a fixação biológica do nitrogênio seja o fator relevante para a promoção do crescimento vegetal, sabe-se que as BPCVs beneficiam a planta por um conjunto de mecanismos aqui já descritos.

Estudos relatam a afinidade de determinadas espécies ou mesmo cultivares de plantas com bactérias, embora essa especificidade não tenha sido claramente evidenciada (PENOT et al., 1992; WANI et al., 1985). Segundo Hungria (2011), o desenvolvimento de inoculantes com estirpes de alta eficiência para cereais depende, essencialmente, da avaliação e seleção de microrganismos para a inoculação em culturas específicas.

As bactérias diazotróficas endofíticas têm mostrado, através de estudos de inoculação, um maior potencial de contribuição para a FBN e que o genótipo da planta influencia na associação planta/bactéria. Essa interação deveria sempre ser considerada nas pesquisas de melhoramento vegetal para que os mecanismos de promoção do crescimento, particularmente a FBN, sejam otimizados (BALDANI; BALDANI, 2005).

Summer (1990) sugere que a inoculação de bactérias obtidas da mesma variedade da planta seja mais eficaz, especialmente quando a comunidade nativa está presente. Isso porque organismos adaptados às condições ambientais da região podem apresentar melhores condições para concorrer com a microbiota nativa, tanto pela adaptação às condições edafoclimáticas, quanto pelo aumento populacional promovido pela inoculação.

Dentre os fatores ambientais, o tipo de solo exerce grande influência sobre a microbiota da rizosfera do milho (EGAMBERDIYEVA, 2007). Alguns estudos indicam que o tipo de solo é o fator determinante responsável pela diversidade da comunidade bacteriana associada às raízes das plantas (LATOURET et al., 1996; CHIARINI et al., 1998; MARSCHNER et al., 2001).

Segundo Fierer e Jackson (2006), a diversidade bacteriana do solo é imensa e pode ser influenciada por uma ampla gama de fatores bióticos e abióticos. No entanto, poucos estudos têm sido realizados a fim de se verificar a influência ambiental sobre as comunidades microbianas na natureza. Nesse estudo, os autores coletaram 98 amostras de solo de toda América do Norte e do Sul e usaram a

metodologia do DNAr-*fingerprinting* para comparar a composição e diversidade quantitativa da comunidade bacteriana. Os resultados mostraram que a diversidade bacteriana não estava relacionada com a latitude do local, temperatura e outras variáveis que normalmente preveem a diversidade vegetal e animal. A diversidade e a riqueza das comunidades bacterianas do solo diferiram pelo tipo de ecossistema, e estas diferenças podem ser explicadas, em grande parte, pelo pH do solo.

Em leguminosas, Ferreira e colaboradores (2000) constataram que o uso de práticas agrônômicas como o plantio direto e a rotação de culturas garantem a manutenção da comunidade de rizóbios e sua diversidade. Além disso, dentro dessa diversidade é possível selecionar estirpes adaptadas com grande potencial na fixação biológica do nitrogênio.

Deve-se admitir que a eficiência da simbiose rizóbio-leguminosas não pode ser alcançada nas interações associativas. Isto se deve ao fato das bactérias associativas localizadas no interior das plantas não apresentarem relação tão complexa e organizada quanto às presentes nas simbioses de bactérias nodulíferas com leguminosas, que é resultante de um processo muito mais evoluído que minimiza perdas do nitrogênio fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos que interagem na complexidade, heterogeneidade e dinâmica do sistema edáfico. No Brasil, inoculantes comerciais para milho já foram formulados com cepas de *Azospirillum brasilense* e elevaram a produção de grãos em 24-30 % (HUNGRIA et al., 2010). Além disso, a promoção do desenvolvimento radicular e a resistência a estresses bióticos e abióticos decorrente das interações associativas aumenta a eficiência da absorção e uso de nutrientes.

Considerando as espécies produtoras de grãos, como trigo, arroz e milho, entre outras, são a principal fonte de carboidrato da dieta humana e o alto potencial fotossintético das gramíneas C4 nos trópicos, os efeitos decorrentes da utilização da tecnologia de inoculação de bactérias eficientes na promoção do crescimento vegetal representam uma grande economia nos custos de produção o que justifica estudos visando consolidar esta estratégia de manejo. No entanto, os sistemas agrícolas atuais são na maioria dependentes de insumos agrícolas industrializados (como adubos nitrogenados) e não exploram o grande potencial dos diazotróficos, tanto para a FBN, quanto para outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal.

### 3.4.1 Plantas-isca e Estratégias de Isolamento

As BPCVs são comumente utilizadas como inoculantes para melhorar o crescimento e o rendimento das culturas agrícolas. No entanto, o rastreio para a seleção de estirpes responsáveis por estimular o desenvolvimento de plantas é crítico (KHALID et al., 2004).

A rizosfera é rica em interações microbianas, porém, estima-se que apenas 1-2 % das bactérias presentes ali podem promover o crescimento de plantas. A triagem e a seleção de estirpes eficientes e sua utilização em práticas agrícolas integradas é de grande importância para a melhoria da produtividade agrícola, juntamente com a manutenção da sustentabilidade dos agro-ecossistemas (RANA et al., 2011).

A seleção de estirpes de rizóbios para inoculação em leguminosas é bem estabelecida e depende, geralmente, de estudos sobre a comunidade bacteriana nodulífera da planta. Métodos de isolamento direto de bactérias simbióticas a partir dos nódulos, que podem ser amostrados em plantas cultivadas no campo, nem sempre é possível (BALA et al., 2001). Rizóbios podem ser isolados também por meio da técnica de armadilha fisiológica, que visa a utilização de uma planta-isca submetida ao plantio com uma rizosfera diluída seriadamente, permitindo, dessa forma, acessar estirpes relevantes, com potencial para uso biotecnológico, de comunidades bacterianas encontradas em menor número na rizosfera (BALA et al., 2001; HANDLEY et al., 1998).

Em estudos com armadilha fisiológica, têm se observado a influência da diluição dos solos na inoculação de plantas-isca: geralmente, estirpes de rizóbios de crescimento rápido são isoladas em nódulos de plantas cultivadas diretamente no solo ou a partir das menores diluições. Isto significa que a diluição do solo possui a vantagem de permitir que as estirpes menos competitivas possam também nodular a planta-isca e contribuir para seu desenvolvimento. Por outro lado, estirpes de rizóbios de crescimento rápido são potenciais alvos para aplicação biotecnológica, visto que são organismos extremamente adaptados ao sistema de interação solo/planta, promovendo eficiente nodulação na planta hospedeira (BALA et al., 2001).

Em 2001, Hungria e colaboradores utilizaram seis genótipos de soja como hospedeiras na técnica de armadilha para isolamento de rizóbios. As plântulas foram inoculadas com 22 amostras em diluição serial de solos de campos

brasileiros, o que favoreceu a seleção de trinta estirpes de crescimento rápido e simbiose efetiva com dois genótipos de soja. O isolamento de rizóbios de crescimento rápido foi também investigado por Marsudi e colaboradores (1999), que empregaram *Acacia saligna* como planta-isca, obtendo-se trinta e nove estirpes com essa característica, enquanto que 94 estirpes foram caracterizadas como de crescimento lento, as quais eram ácido-tolerantes, halo-sensíveis e álcali-sensíveis.

A identificação de microrganismos eficientes na promoção do crescimento de plantas que apresentem potencial aplicação como insumo biotecnológico é uma tarefa laboriosa e demorada. Por outro lado, metodologias específicas desenvolvidas para o isolamento de bactérias simbiotes com leguminosas estão disponíveis e consolidadas na literatura. O desenvolvimento de uma metodologia específica para o isolamento de BPCVs pode ser alcançado a partir do conhecimento disponível sobre a ecologia deste grupo bacteriano e as estratégias utilizadas para isolar simbiotes altamente eficientes. O conhecimento da diversidade de BPCVs em solos sob diferentes tipos de uso pode fornecer indicativos dos melhores sítios de prospecção de isolados elite, bem como identificar estratégias de manejo que favoreçam a ocorrência deste grupo bacteriano nos solos de cultivo agrícola.

#### 3.4.2 Caracterização Bioquímica dos Isolados

A caracterização bioquímica dos isolados permite selecionar estirpes que apresentem maior probabilidade de eficiência no processo de colonização, promoção do crescimento e controle biológico *in vivo* (BERNARDES et al., 2010; RANA et al., 2011). Análises bioquímicas como: a formação de película em meios semi-sólidos específicos (indicativo de crescimento de diazotróficos), solubilização de fosfatos, produção de auxinas e de enzimas líticas são características importantes e desejáveis para a obtenção de isolados elite.

O nitrogênio, além do carbono e do hidrogênio, é o elemento mais abundante na matéria viva, participando da composição de moléculas de ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos entre outras. Grande parte do Nitrogênio fixado presente nos ecossistemas terrestres e aquáticos é originado da FBN, uma vez que o N<sub>2</sub> não é assimilável pela maioria dos seres vivos e por isso faz-se necessário sua transformação para uma forma combinada que facilite sua

assimilação. Apenas uma pequena parcela dos organismos procariotos, denominados diazotróficos, consegue converter ou reduzir enzimaticamente, através do complexo enzimático da nitrogenase, o nitrogênio da atmosfera em amônia, a qual pode ser incorporada em macromoléculas pelas vias assimilatórias do N (MARIN et al., 1997).

O fósforo é quantitativamente o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal, correspondendo a 0,2 % do peso seco da planta. Trata-se de um nutriente limitante para o crescimento, tendo em vista a participação ativa nas atividades metabólicas e bioquímicas, além da formação de ácidos nucleicos e fosfolipídios (KUCEY, 1988; GYANESHWAR et al., 2002). É encontrado principalmente na forma insolúvel como complexos de matéria orgânica ou na forma inorgânica, como precipitados com íons  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Al}^{+3}$  ou adsorvidos às superfícies de partículas minerais do solo. A liberação do fósforo insolúvel na forma orgânica geralmente envolve a ação de fosfatases produzidas por bactérias solubilizadoras de fosfatos. Na forma inorgânica, a liberação do fósforo é feita por fatores estritamente físico-químicos e alterações em fatores como a acidificação do solo em decorrência da liberação de prótons pela planta e de ácidos orgânicos pelos microrganismos, favorecendo a solubilização de fosfatos (NOVAIS et al., 2007). A solubilização microbiana de fosfato mineral pouco solúvel no solo é um processo importante nos ecossistemas naturais e agrícolas (MIKANOVA; NOYAKOVÁ, 2002).

As auxinas são hormônios importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo o ácido-3-indol acético (AIA) a forma predominante e a de maior relevância fisiológica. As auxinas controlam processos como: dominância apical, expansão celular, diferenciação vascular, formação de raízes laterais e pelos radiculares, fototropismo e gravitropismo (HARTMANN et al., 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004). Diversas bactérias associativas são produtoras de auxinas e, dessa forma, participam da promoção do crescimento vegetal (COSTACURTA; VANDERLEYDEN, 1995; PATTEN; GLICK, 1996). O papel desse fitormônio para as bactérias é pouco conhecido, porém, considera-se que a produção de auxinas por bactérias seja um mecanismo de interação com a planta (SPAEPEN et al., 1995; PATTEN; GLICK, 1996).

A produção de enzimas líticas por microrganismos está vinculada principalmente ao processo de controle biológico de fitopatógenos bem como ao

mecanismo de penetração ativa no tecido vegetal (QUADT-HALLMANN et al., 1997; PUNJA; UTKHRDE, 2003; RATÓN et al., 2011; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). A inibição do crescimento de um microrganismo por outro através da produção de compostos tóxicos, antibiose, é um método amplamente empregado para avaliar o potencial de ação de bactérias principalmente sobre fungos fitopatogênicos (BARRA et al., 2008; BARRETO et al., 2008; COOK; BAKER, 1983).

### 3.4.3 Caracterização Molecular dos Isolados

Testes bioquímicos e fenotípicos a partir de colônias isoladas de células bacterianas auxiliam na identificação das espécies (PROSSER, 2002), porém, não fornecem informações sobre as relações evolutivas dos organismos, o que deveria ser a base para um sistema de classificação (HUNGENHOTLZ; PACE, 1996).

Com o advento das técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) (SAIKI et al., 1985) e sequenciamento de DNA (SANGER et al., 1977), os métodos moleculares, especialmente aqueles baseados no estudo da sequência do gene 16S RNAr, conseguem definir a posição das bactérias em nível taxonômico de gênero e, em alguns casos, de espécie (GARRITY; HOLL, 2001). Desta forma, oferecem novas oportunidades para a análise da estrutura genética e composição de espécies de comunidades microbianas.

Para a caracterização da variabilidade das espécies existem muitas variações da técnica de PCR que geram perfis diferenciados e facilitam o estudo dos isolados (STRALIOTO, 2005). Além da análise comparativa do sequenciamento do gene 16S DNAr, outras técnicas podem ser empregadas nos estudos filogenéticos, como a técnica de BOX-PCR. Oligonucleotídeos específicos (BOX, ERIC e REP) têm sido frequentemente utilizados nos estudos de diversidade genética. Trata-se de um método internacionalmente reconhecido de caracterização de estirpes, denominado de Rep-PCR (*Repetitive Sequence Based PCR* – PCR baseado em sequências repetitivas) que amplificam sequências repetidas do DNA, gerando perfis eletroforéticos que promovem a chamada impressão digital do organismo (*fingerprinting*) (VERSALOVIC et al., 1991; DE BRUIJN, 1992).

O sequenciamento dos genes que codificam RNAr (16S, 23S e 5S) tem sido amplamente empregado para os estudos de diversidade e caracterização genotípica dos isolados procariotos. Os DNAs ribossomais são moléculas altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução e não sofrem influências momentâneas por mudanças no meio ambiente (MOREIRA et al., 2010). Atualmente, o gene 16S RNAr é o mais utilizado para inferir a respeito das relações filogenéticas entre as bactérias (MOREIRA et al., 2010).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ARMADILHA FISIOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS

A metodologia desenvolvida para o isolamento de bactérias associativas promotoras do crescimento vegetal foi adaptada da metodologia denominada armadilha fisiológica, desenvolvida para o isolamento de rizóbios, que tem como objetivo selecionar as estirpes mais relevantes para o uso na agricultura e que podem estar presentes no solo baixa população. Diluindo-se o solo em areia pode-se detectar pequenas populações ali instaladas que teriam seu crescimento inibido por cepas numericamente mais abundantes (HANDLEY et al., 1998). O emprego do milho como planta-isca na armadilha fisiológica visa selecionar estirpes altamente específicas com potencial para o crescimento desta gramínea.

O desenvolvimento da metodologia foi realizado no delineamento estatístico inteiramente casualizado com cinco repetições (Tabela 1). Neste estudo, avaliou-se a utilização de diferentes tipos de solos: agrícola 1 (rotação de culturas – timbó/horticultura), agrícola 2 (área de pousio pós cultivo de milho), de gramado (cobertura permanente com *Paspalum notatum* – grama batatais), e de floresta (cobertura permanente com mata secundária), diluídos em diferentes concentrações de areia estéril (autoclavada 3 vezes em dias alternados), com o objetivo de restringir a disponibilidade de nutrientes às plantas-isca e diminuir as populações microbianas nativas de cada tipo de solo a fim de se obter isolados bacterianos que apresentem capacidade de associação com plantas de milho nestas condições.

**Tabela 1** – Croqui do experimento. Cada tratamento apresentado foi realizado para o isolamento de bactérias associativas em cultivares de milho em cinco repetições.

Tratamentos <sup>1</sup>	Solos <sup>2</sup>			
Solo 100 %	Agrícola 1	Agrícola 2	Gramado	Floresta
Solo 50 %	Agrícola 1	Agrícola 2	Gramado	Floresta
Solo 25 %	Agrícola 1	Agrícola 2	Gramado	Floresta

<sup>1</sup>Os tratamentos Solo 50% e Solo 25% foram diluídos em areia esterilizada nas respectivas proporções (p/p).

<sup>2</sup>Agrícola 1: rotação de culturas – timbó/horticultura; Agrícola 2: área de pousio pós cultivo de milho; Gramado: cobertura permanente com *Paspalum notatum* (grama batatais); Floresta: cobertura permanente com mata secundária.

Os solos agrícola (1 e 2) e o de floresta foram amostrados na fazenda escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL); o solo de gramado foi coletado em uma região de praça pública da mesma cidade, com vegetação típica permanente há mais de 10 anos (Figura 3).

**Figura 3** – Amostragem dos solos experimentados.



A = Ponto de coleta do Solo Agrícola 1 (rotação de culturas: timbó/horticultura); B = Ponto de Coleta do Solo Agrícola 2 (área de pouso); C = Ponto de coleta do Solo de Gramado; D = Ponto de coleta do Solo de Floresta.

A amostragem dos foi realizada a uma profundidade de 0-10 cm, pois é nesse intervalo que se encontra a maior parte da biomassa microbiana. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas quimicamente (Tabela 2).

**Tabela 2** – Características químicas dos solos experimentais (0-10cm).

Solo	pH (em CaCl <sub>2</sub> )	K	Ca	Mg	Al	P	C
			(cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )			g Kg <sup>-1</sup>	
Agrícola 1	5,6	0,54	6,57	1,88	0,05	10,7	16,17
Agrícola 2	5,1	0,54	4,81	1,16	0,11	12,7	14,79
Gramado	5,5	0,55	6,38	2,25	0,13	18,2	13,76
Floresta	5,2	0,33	10,45	1,67	0,08	6,9	12,21

O município de Londrina está localizado no Norte do Estado do Paraná, entre as coordenadas 23° 19' 13" O, apresenta altitude média de 566 m, variando entre 356 m e 851 m – e extensão territorial de 1.651 Km<sup>2</sup>. A temperatura média anual é de 20,9 °C, no mês mais quente (Janeiro) 24,0 °C, no mês mais frio (Junho) 16,6 °C e máxima média de 27,9 °C. Por ser zona original de floresta tropical subperenifólia (estacional semidecidual), Londrina apresenta clima do tipo Cfa (h) segundo a classificação de Köppen (clima subtropical, úmido, com média do mês mais quente superior a 22 °C) (BOGNOLA et al., 2011).

A simplificação geomórfica está refletida na composição pedológica, onde sobressai o Latossolo Vermelho (LV) com caráter férrico – solo constituído por material mineral com matriz 2,5 YR ou mais vermelho na maior parte dos primeiros 100 cm de horizonte B (inclusive BA). Os LV com caráter férrico contribuem com boa parte da pujança do cultivo de grãos paranaense. As boas condições geoclimáticas permitem de 2,5 a 3 cultivos anuais, com grande dominância da sucessão soja, milho e trigo (BOGNOLA et al., 2011).

#### 4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Utilizaram-se sementes do híbrido de milho AG 2040 (Monsanto Company) e vasos plásticos com capacidade para 8 Kg de solo, esterilizados com etanol 70% (v/v), preenchidos com as misturas definidas na Tabela 1 (APÊNDICE A).

As sementes desinfestadas foram germinadas em condições assépticas previamente à sementeira, sobre papel filtro embebido com água destilada estéril por 3 dias a 30°C (APÊNDICE B). A desinfecção das sementes

ocorreu com álcool 95% por 30 segundos e peróxido de hidrogênio 5% por 10 minutos com posterior lavagem com água destilada estéril. Decorrido o período de germinação foi realizado um teste de qualidade microbiológica das sementes, na qual uma alíquota foi macerada e inoculada em meio Dygs (ANEXO A).

Para o transplântio foram escolhidas as plântulas que não apresentaram sinais de contaminação por microrganismos e um desenvolvimento homogêneo. Foram transplantadas 3 plântulas de milho por vaso, cultivando-se por 45 dias em casa de vegetação. As plantas foram regadas com solução nutritiva pobre em Nitrogênio (ANEXO B) (KAWAMITSU et al., 1999) semanalmente. Ao final do período de crescimento, as duas plantas de cada vaso que apresentaram o maior índice de clorofila foram coletadas. As raízes foram lavadas com água e utilizadas para o isolamento de representantes da comunidade bacteriana.

#### 4.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Para o isolamento de bactérias diazotróficas, as raízes foram lavadas com água corrente. Após a lavagem, 1 g de raiz foi macerada em 9 mL de solução salina (ANEXO C) com o auxílio de grau e pistilo (diluição 10<sup>-1</sup>). As amostras foram diluídas serialmente, acrescentando-se 1 mL da diluição original a tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada. Das diluições 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>, uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em frascos contendo 5 mL dos meios de cultura semi-sólidos seletivos para determinados gêneros de bactérias diazotróficas (Tabela 3), com 3 repetições. Os frascos inoculados foram incubados a 30°C por um período de até 7 dias para o desenvolvimento de um película (APÊNDICE C) na região superficial do meio (adaptado de DÖBEREINER et al., 1995).

**Tabela 3** – Meios de cultivo seletivos livres de nitrogênio direcionados para o isolamento de bactérias diazotróficas comumente encontradas em tecidos vegetais de gramíneas e respectivos grupos-alvo (ANEXO D).

Bactéria	Meio Semi-Seletivo				
	JMV	LGI	LGI-P	JNFb	NFb
<i>Azospirillum</i> spp		X			X
<i>Burkholderia</i> spp	X	X			
<i>Gluconacetobacter</i> spp			X		
<i>Herbaspirillum</i> spp				X	
<i>Sphingomonas</i> spp		X		X	

Após crescimento, os isolados foram reinoculados nos respectivos meios semi-sólidos buscando a seleção dos microrganismos diazotróficos. Posteriormente, as amostras dos meios com crescimento positivo foram riscados em placa contendo os correspondentes meios de cultura solidificados para verificação da pureza da colônia (APÊNDICE D). Este processo - denominado purificação - se repetiu até a obtenção de placas com apenas um morfotipo de colônia (DÖBEREINER et al., 1995). Após purificação, os isolados foram crescidos em meio Dygs líquido por 24 h a 180 rpm e 30 °C, diluídos em glicerol 50 % (v/v) e armazenados a -20 °C.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

##### 4.4.1 Extração do DNA Genômico

Para a obtenção do DNA total, os isolados bacterianos foram crescidos em meio Dygs por 12 horas a 30°C em rotação orbital. Alíquotas de 1 mL de cultura foram transferidas para microtubos esterilizados e centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm e 4 °C. A massa de células foi submetida a uma lavagem com solução salina estéril (NaCl 0,9 %), centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm e 4°C. Logo após, as células foram homogeneizadas em vórtex em 0,5 mL de tampão CTAB (CTAB 2%, PVP 1%, Tris-HCl 100 mM, EDTA 25 mM, e NaCl 1,4 mM), aquecidas por 20 min a 80 °C e esfriadas em banho de gelo. Acrescentou-se 1 µL de RNase (20 µg/mL) e incubou-se a 37 °C por 1 h. Foi adicionado 0,5 mL de solução

de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitou-se em vórtex por aproximadamente 30 s. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm e 4 °C e os sobrenadantes coletados e transferidos para novos microtubos. Ao sobrenadante foi acrescentado 0,6 volumes de isopropanol e incubou-se por 1 h a -20 °C. Transcorrido o período de incubação, as amostras foram novamente centrifugadas por mais 30 minutos a 14.000 rpm e 4 °C. Os sobrenadantes foram desprezados e ao *pellet* foi adicionado 100 µL de NaCl 5 M e 400 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão por 30 s e centrifugados por 10 min a 14.000 rpm e 4 °C. Os *pellets* obtidos foram lavados com solução de etanol 70% em água (v/v) e secos por 1 h a temperatura ambiente, sendo em seguida ressuspensos em 50 µL de água ultrapura estéril. Os extratos foram quantificados a 260 nm em espectrofotômetro Genesys 6 (Thermo Scientific), onde tiveram a pureza avaliada pela relação das absorvâncias D.O.<sub>260</sub>/D.O.<sub>280</sub> nm e sua integridade observada após eletroforeses em gel de agarose 1 % em tampão TBE.

#### 4.4.2 Amplificação do DNA Genômico pela Técnica de Rep-PCR Utilizando o Oligonucleotídeo Iniciador BOX

O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR (polymerase chain reaction - reação em cadeia da polimerase) com o oligonucleotídeo iniciador BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (VERSALOVIC et al., 1994).

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 50 µL contendo: 2,0 µL dNTPs (estoque com 1,5 mM de cada base); 5 µL tampão 10X (10mM Tris-HCL pH 8,3); 6 µL MgCl<sub>2</sub> (20 mM); 3 µL oligonucleotídeo BOX (20 pMol µL<sup>-1</sup>); 1 µL DNA molde (50 ng/µL); 0,3 µL Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 32,7 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. A mistura da reação foi submetida ao termociclador BIOER-TC-96-G-H(b) usando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (1 min a 50 °C) e extensão (5 min a 68 °C); um ciclo de extensão final a 68°C por 15 min; manutenção a 4 °C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese a 60 V em gel de agarose 2,5% em cuba horizontal com tampão TBE 1 X (10,8 g de Tris-

base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução) por 5 horas. Como padrão de perfil molecular foram utilizados estirpes de *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *B. tropica*, *G. diazotrophicus*, *A. amazonense* e *A. brasilense*. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A visualização dos fragmentos foi realizada em transluminador de luz ultravioleta e documentada com equipamento de fotografia Loccus Biotecnologia (APÊNDICE E). Para confirmar os resultados obtidos, foram utilizados os controles positivo e um controle negativo para cada conjunto de reações de amplificação. Cada amostra foi submetida à PCR pelo menos duas vezes.

O perfil das bandas no gel foi transformado em uma matriz binária, utilizando o conjunto de programas estatísticos NTSYS-pc versão 2.1 (Applied Biostatistics). As relações genéticas foram medidas através do coeficiente de Jaccard. O dendograma de similaridade genética foi obtido pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair – Group Method with Aritmetical Average).

#### 4.4.3 Sequenciamento

##### 4.4.3.1 Ampliação do gene 16S RNAr por PCR

A amplificação das sequências do gene 16S DNAr dos isolados foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores 27f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e 1492r (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (GURTLER; STANISICH, 1996).

Para reação de PCR foram utilizados 50 ng de DNA dos isolados, 1,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador ( $20 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5 mM de cada), 5  $\mu\text{L}$  de tampão 10x (10mM Tris-HCL pH 8,3), 2,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1,5 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura estéril para um volume final de 50  $\mu\text{L}$ . A termociclagem seguiu com uma etapa de desnaturação inicial (94 °C, 2 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 min), anelamento (58 °C, 1 min) e extensão (72 °C, 2 min).

Após amplificação, alíquotas de 8  $\mu\text{L}$  dos produtos da PCR foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão TBE 1X e corado com brometo de etídeo. As amostras que apresentaram uma banda no tamanho esperado (1500 pares de base) foram purificadas para reação de sequenciamento.

#### 4.4.3.2 Purificação e quantificação dos produtos de amplificação

A purificação, quantificação e sequenciamento do material genético foram realizadas no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba/PR).

A reação de purificação foi conduzida em placa com 96 poços utilizando-se: 6  $\mu\text{L}$  do produto de amplificação; 3,3 U da enzima Exonuclease I (EXO I); 0,66 U da enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP); e água ultrapura para 10  $\mu\text{L}$  da reação. As amostras foram submetidas à termociclagem (Veriti 96 Well Thermal Cycler – Biosystems) a 70 °C e a 80 °C por 15 min.

Após purificação, foi feita a quantificação do DNA em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm para as reações de sequenciamento.

#### 4.4.3.3 Reação de sequenciamento

As reações de PCR para o sequenciamento foram realizadas utilizando-se o Kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). O protocolo da reação foi conduzido conforme as especificações do fabricante: 20 ng do DNA purificado; 0,5  $\mu\text{M}$  do oligonucleotídeo iniciador 27f; 1  $\mu\text{L}$  do terminador Big Dye; 2  $\mu\text{L}$  do tampão Save Money (Tris-HCl 400mM pH 9,0 e MgCl<sub>2</sub> 10 mM); e água ultrapura estéril para 10  $\mu\text{L}$  de reação. As condições de termociclagem (Veriti 96 Well Thermal Cycler – Biosystems) foram: desnaturação inicial (96 °C, 1 min), seguida de 30 ciclos de desnaturação (96 °C, 15 seg), anelamento (58 °C, 10 seg) e extensão (60 °C, 4 min).

Decorrida a amplificação, o DNA foi precipitado adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 2  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 4 M e 60  $\mu\text{L}$  etanol absoluto (3x V/V). A microplaca foi centrifugada (Centrífuga 5810 R, Eppendorf) a 3.500 rpm por 45 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e secou-se a microplaca sobre um papel absorvente. O DNA sedimentado foi lavado com 80  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % e centrifugado por mais 10 min. Novamente descartou-se o sobrenadante, secou-se a placa a vácuo por 40 min e ressuspendeu-se o DNA com 10  $\mu\text{L}$  de formamida. O

sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems).

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

Todas as determinações bioquímicas realizadas com os isolados foram comparadas aos ensaios das estirpes padrões (*H. rubribalbicans*, *H. seropedicae*, *B. tropica*, *A. brasilense*).

##### 4.5.1 Produção de Compostos Indólicos (Auxinas)

A produção de compostos indólicos foi quantificada por colorimetria utilizando o reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995) modificado (BAUTISTA; GALLARDO, 2008). As células foram crescidas em 5 mL de meio Dygs acrescido de DL-triptofano ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Merck) por 24 horas, 100 rpm a 30 °C. Uma alíquota de 2 mL foi coletada, as células foram centrifugadas (8.000 rpm; 5 min) e o extrato livre de células (ELC) utilizado nas reações. A reação foi realizada em tubos de vidro, onde 1 mL do sobrenadante reagiu com 2 mL do reagente de Salkowski modificado ( $\text{FeCl}_3$  40 mM;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7,9 M). Após 25 minutos de reação no escuro, a intensidade da coloração foi medida a 540 nm em espectrofotômetro Genesys 6 (Thermo Scientific) (APÊNDICE F).

A quantidade de auxina foi determinada utilizando uma curva padrão com concentrações crescentes (0 a  $100 \mu\text{M mL}^{-1}$ ) de ácido-3-indol acético sintético 99% (Acros-Organics) com base na curva de calibração.

##### 4.5.1.1 Determinação de proteínas

O teor de proteínas total foi determinado com o objetivo de normalizar as leituras de produção de auxinas. Para determinação do teor de proteínas foi utilizado o mesmo cultivo do ensaio de determinação de auxinas. Uma alíquota de 1 mL das culturas foi coletada e adicionado 1 mL de NaOH 0,1 M. As amostras foram agitadas e incubadas por 15 min a 90 °C para lise celular. A concentração de proteínas foi determinada através do método descrito por Lowry e colaboradores (1951) utilizando como padrão soroalbumina bovina  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

#### 4.5.2 Solubilização de Fosfatos

A solubilização de fosfatos pelos isolados foi avaliada em meio NBRIP solidificado, descrito por Nautiyal (2000). Para isso, os isolados foram crescidos em meio Dygs por 24 h a 30 °C e 180 rpm e posteriormente repicados no centro da placa de meio NBRIP, as quais foram incubadas por 6 dias a 30 °C. Mensurou-se o diâmetro dos halos e das colônias e calculou-se o índice enzimático (IE) por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (BERRAQUEIRO et al., 1976).

#### 4.5.3 Determinação de Enzimas Líticas

As bactérias foram cultivadas agar leite e agar amido (DUARTE et al., 2009) e incubadas a 30 °C por 5 dias para a detecção da atividade de proteases e amilases, respectivamente. Os testes mostraram-se positivos quando houve o aparecimento de halo ao redor das colônias, sendo realizada a determinação dos respectivos índices enzimáticos.

A atividade celulolítica foi determinada utilizando-se a metodologia de Teather e Wood (1982) modificada por Rehman e colaboradores (2009). Placas com meio solidificado contendo carboximetilcelulose (CMC) 1 % foram utilizadas para este ensaio. Foram realizados orifícios no ágar solidificado com o auxílio de um cortador (6,5 mm de diâmetro), no qual depositou-se uma suspensão de  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> dos isolados obtidos. Após inoculação, as placas foram incubadas por 7 dias a 30 °C, quando foi mensurado o diâmetro dos halos (APÊNDICE G).

#### 4.5.4 Atividade Antifúngica

O teste de cultura pareada (SHIOMI et al., 2008) foi utilizado para a determinação da atividade antagonista ao fungo *Fusarium* sp, cepa gentilmente cedida pelo Laboratório de Genética de Fungos do Departamento de Ciências Biológicas / UEL. Os isolados foram inoculados em meio Dygs solidificado por meio de quatro estrias equidistantes e incubados por 24 h a 25 °C. Um disco de 5 mm do micélio do fungo foi disposto no centro de cada placa, incubando-se por 7 dias a

mesma temperatura. A inibição foi avaliada por medições do raio do crescimento do fungo, comparando-se com um teste controle, na ausência dos isolados.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS

Os isolados foram inoculados, individualmente, sobre sementes do híbrido de milho 2B587HX (Dow AgroSciences) para análise de germinação. Para isto, as sementes foram desinfestadas previamente com álcool 95% por 30 segundos e peróxido de hidrogênio 5% por 10 minutos e posterior lavagem com água destilada estéril. As estirpes foram crescidas em meio Dygs por 12 h a 30 °C e 180 rpm, padronizadas a  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> e inoculadas por imersão (5 min) nas sementes de milho desinfestadas. Inocularam-se 20 sementes de milho por estirpe. A germinação ocorreu em folhas de papel “germitest” umidecidas com água destilada estéril cujo volume adicionado (mL) correspondeu a 3 vezes o peso de três folhas de papel (g). Após incubação de 72 h a 28 °C, avaliou-se o comprimento da raiz principal das sementes germinadas através do programa AutoCad (versão 2012) (APÊNDICE H). Para comparação dos dados, o teste de germinação foi também realizado com as estirpes padrões (*H. rubribalbicans*, *H. seropedicae*, *B. tropica*, *A. brasilense*), além de um teste controle com o sobrenadante da cultura crescida com *Azospirillum brasilense*, pois há relatos na literatura que os metabólitos gerados durante a cultura podem influenciar positivamente o desenvolvimento de raízes e massa aérea de plantas (RADWAN et al., 2004; PERRIG et al., 2009).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS ÀS RAÍZES DE PLANTAS DE MILHO

Foram obtidos 63 isolados de bactérias diazotróficas associados às raízes de plantas de milho cultivadas nos diferentes tratamentos (Tabela 4). Este número provavelmente não revela a comunidade culturável real deste experimento, já que foram utilizados meios de cultura semi-seletivos e diluições maiores a fim de selecionar estirpes fixadoras de nitrogênio de comunidade elevada (diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ ), considerando que estas estabeleçam uma estreita relação de alta afinidade com a planta-isca. A limitação do isolamento seletivo da comunidade culturável se aplica à maioria dos estudos baseados em métodos de cultivo, entretanto, estes métodos fornecem indicações relativas da estrutura da comunidade microbiana.

**Tabela 4** – Número de isolados diazotróficos obtidos de raízes de milho híbrido AG 2040 (Monsanto) sob diferentes tipos e diluições de solos, e meios de cultura seletivos.

Tratamentos <sup>1</sup>		Número de Isolados em Meios de Cultura Semi-Sólidos					Total					
		NFb	JNFb	JMV	LGI	LGI-P						
Total de Isolados por Tratamento	Solo (100 %)	5	8	3	3	0	19					
	Solo (50 %) + Areia (50 %)	3	2	6	4	3	18					
	Solo (25 %) + Areia (75 %)	4	7	6	4	5	26					
	<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>63</b>					
Solo Agrícola 1 (A)	Solo A (100 %)	0	0	0	0	0	0	Total de Isolados por Solo	19			
	Solo A (50 %) + Areia (50 %)	1	2	2	0	1	6					
	Solo A (25 %) + Areia (75 %)	3	3	3	2	2	13					
Solo Agrícola 2 (B)	Solo B (100 %)	1	1	1	1	0	4		Total de Isolados por Solo	16		
	Solo B (50 %) + Areia (50 %)	1	0	1	1	1	4					
	Solo B (25 %) + Areia (75 %)	1	1	2	1	3	8					
Solo de Gramado (C)	Solo C (100 %)	3	6	2	1	0	12			Total de Isolados por Solo	19	
	Solo C (50 %) + Areia (50 %)	1	0	2	1	0	4					
	Solo C (25 %) + Areia (75 %)	0	1	1	1	0	3					
Solo de Floresta (D)	Solo D (100 %)	1	1	0	1	0	3				Total de Isolados por Solo	9
	Solo D (50 %) + Areia (50 %)	0	0	1	2	1	4					
	Solo D (25 %) + Areia (75 %)	0	2	0	0	0	2					
<b>Total</b>		<b>12</b>	<b>17</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>63</b>					<b>63</b>

<sup>1</sup>Conforme Tabela 1.

O experimento foi realizado em quatro etapas, trabalhando-se com um tipo de solo por vez, sendo que cada etapa apresentou três tratamentos com cinco repetições: 1. Solo (100 %); 2. Solo (50 %) + Areia (50 %) e; 3. Solo (25 %) + Areia (75 %).

O solo agrícola foi experimentado duas vezes devido à falta de isolados no tratamento Solo Agrícola 1 (100 %). A primeira coleta foi realizada em área de rotação de culturas e a segunda em área de pousio. O não isolamento de bactérias neste tratamento possivelmente ocorreu em virtude da compactação do solo nos vasos, prejudicando a aeração e a absorção de nutrientes pelo vegetal, fator que ocasionou a morte de algumas plantas cultivadas nesse solo.

O número de bactérias em cada tratamento teve grande variação, provavelmente devido às condições de cultivo e ao tipo de solo. A colonização microbiana de raízes de plantas é afetada por fatores bióticos e abióticos assim como exsudatos, competição, nutrientes inorgânicos, pH e tipo de solo, temperatura e uso de agroquímicos. Além disso, o genótipo da planta hospedeira exerce uma influência substancial sobre a estrutura e função das comunidades microbianas associadas à rizosfera (BERG; SMALLA, 2009; CHIARINI et al., 1998; HALLMAN et al., 1997).

A análise comparativa do total de isolados por tratamento, revela que obteve-se maior número de microrganismos (26 isolados) no tratamento Solo (25 %) + Areia (75 %), seguido pelo tratamento Solo (100 %) com 19 isolados e tratamento Solo (50 %) + Areia (50 %) com 18 isolados. Os meios de cultura JNFb, semi-seletivo para os gêneros *Herbaspirillum* spp e *Sphingomonas* spp, e JMV, semi-seletivo para o gênero *Burkholderia* spp, forneceram a maior quantidade de isolados, com 17 e 15 indivíduos, respectivamente. A menor quantidade de isolados (8 no total) foi obtida com o uso do meio LGI-P, semi-seletivo para *Gluconacetobacter* spp.

Considerando os tipos de solos e os tratamentos por diluição utilizados para a seleção de diazotróficos nativos, os resultados indicam que as características físico-químicas dos solos possuem grande influência sobre a eficiência de isolamento pela metodologia aplicada. Os solos agrícola (1 e 2), com maior fertilidade química decorrente das práticas de manejo, e o solo de floresta, que exhibe vegetação mista (arbórea/herbácea), apresentaram uma correlação positiva ( $r = 0,901; 0,966; 0,723$ ; respectivamente) entre o número de isolados diazotróficos e

sua diluição em areia. Por outro lado, o solo de gramado que não recebe nenhum aporte de nutrientes industriais, apresentou uma correlação negativa ( $r = -0,912$ ) entre o número de isolados obtidos e os tratamentos de diluição, ou seja, houve decréscimo no número de isolados quando a diluição foi aumentada. Estes resultados reforçam a ideia de que plantas sob estresse nutricional apresentam maior compatibilidade à associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal. O maior número de isolados resultantes do tratamento de solo de gramado sem diluição evidencia o fato de que bactérias nativas adaptadas ao meio (solo/planta) estabeleceram uma melhor interação com a planta-isca. Em outras palavras, a utilização de uma gramínea como planta-isca favoreceu o desenvolvimento de populações específicas da comunidade bacteriana instalada no solo de gramado.

As raízes das plantas desempenham um papel importante na formação de comunidades microbianas no solo. Embora os exsudatos liberados pelas raízes das plantas apresentem uma grande variedade de compostos orgânicos, a qualidade e a composição do solo podem variar de acordo com as espécies de plantas e seus estágios de desenvolvimento. Devido a esta variação em exsudação, diferentes espécies de plantas crescendo no mesmo tipo de solo conferem comunidades microbianas divergentes. No entanto, quando comunidades microbianas associadas às mesmas espécies de plantas que crescem em diferentes tipos de solos são analisadas, o tipo de solo pode exercer uma grande influência sobre a diversidade microbiana (BALOTA et al., 2003; HARTMANN et al., 2009; SALLES et al., 2004).

A fim de se reduzir fontes de variação que influenciam diretamente a microbiota do solo rizosférico de um ecossistema (como espécie, genótipo e idade da planta, tipo de solo e manejo), Castellanos e colaboradores (2009) utilizaram plantas de milho de mesma idade e solos agrícolas de regiões distintas com propriedades físico-químicas semelhantes e com histórico de manejo parecido, para avaliar a diversidade bacteriana da rizosfera do milho. Este estudo mostrou que as variabilidades regional e geográfica influenciaram a diversidade bacteriana das rizosferas analisadas, especialmente na composição da comunidade de *Proteobacteria* e *Pseudomonas*.

Em um estudo de campo realizado na EMBRAPA Agrobiologia (Seropédica, RJ), Gomes e colaboradores (2001) avaliaram a diversidade bacteriana

da rizosfera associada a dois genótipos de milho transgênicos (Nitroflint e Nitrodent) em diferentes estágios de crescimento. Os autores constataram, através das análises do gene 16S RNAr por TGGE, que as sequências genéticas dos clones predominantes indicaram que a comunidade prevalecente encontrada em todas as fases do crescimento das plantas pertenceu ao gênero *Artrobacter*. Ainda, os resultados sugeriram que alfa-proteobactérias constituíram a comunidade dominante da rizosfera de plantas de milho jovem.

Roesch e colaboradores (2007) estudaram a diversidade bacteriana de diazotróficos associada a plantas de milho em diferentes solos de cinco regiões do Rio Grande do Sul. Os resultados revelaram que influências geográficas e ambientais podem gerar a associação de diferentes bactérias diazotróficas endofíticas com plantas de milho. Porém, a ocorrência de espécies de bactérias como *Klebsiella* e *Azospirillum* não dependeram do ambiente. As comunidades bacterianas amostradas da região norte do Estado, as quais mostraram maior disponibilidade de água e teor de argila, tenderam a apresentar maior diversidade quando comparada às comunidades amostradas em outras regiões.

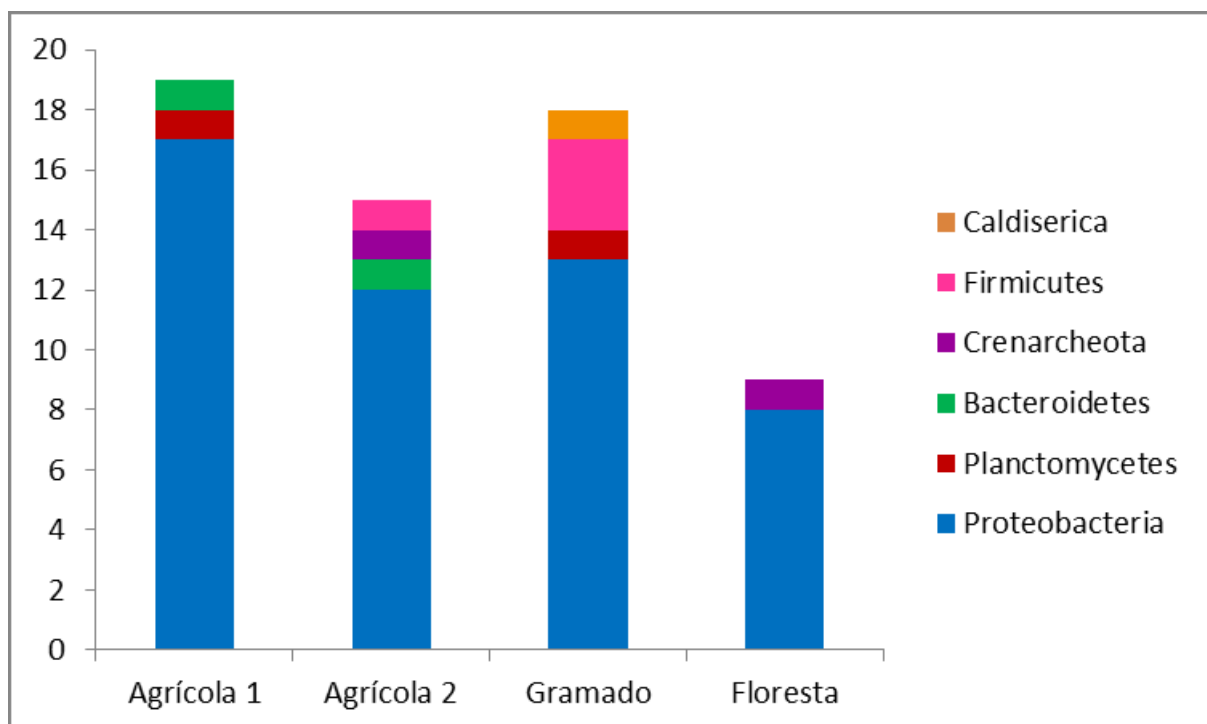
Ecossistemas ricos em biodiversidade geralmente sequestram mais carbono no solo do que aqueles com biodiversidade reduzida. Em 2008, Asuming-Brempong e colaboradores realizaram um estudo comparativo a fim de se testar a hipótese de que o carbono retido no solo de diferentes áreas em pousio afetam diretamente a estrutura da comunidade microbiana. Os solos amostrados pertenciam à Estação Experimental Agrícola Kpeve em Gana, África Ocidental, e incluíam cinco tratamentos: 1. Milho, seguindo a prática natural de pousio onde o capim elefante é queimado e nenhum fertilizante é adicionado ao milho; 2. Milho seguindo o pousio após cultivo de ervilha; 3. Milho semeado em área de pousio permanente; 4. Milho fertilizado seguindo o pousio de capim elefante nativo; 5. Área nativa sem plantio. Os resultados mostraram que o índice de carbono retido teve efeito significativo para a comunidade proteobactérias nos solos. Assim, solos com índices elevados de carbono armazenado apresentaram alta comunidade de proteobactérias. A prática de manejo que permitiu maior uniformidade das comunidades bacterianas, menor dominância de espécies e maior biodiversidade total da comunidade microbiana foi o tratamento 3.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação filogenética dos isolados obtidos neste estudo foi realizada pela análise comparativa das sequências do gene 16S RNAr. Foram classificados 61 isolados (2 isolados não apresentaram qualidade mínima de sequência para realização de análise comparativa). Dos isolados identificados, 19 foram procedentes do solo agrícola 1; 15 do solo agrícola 2; 18 do solo de gramado; e 9 do solo de floresta.

Utilizando a classificação do RPD II (*Ribossomal Database Project*) pelo programa *Classifier*, identificaram-se 6 filos (Figura 4).

**Figura 4** – Identificação dos isolados obtidos a partir da metodologia de armadilha fisiológica ao nível de filo. Solos experimentados (Agrícola 1, Agrícola 2, Gramado e Floresta) conforme a Tabela 1.



**Fonte:** a autora (2013).

Cerca de 96,7 % dos isolados pertencem ao Domínio *Bacteria* e 3,3 % ao Domínio *Archea*, sendo o filo *Crenarcheota* seu único representante. A maioria dos isolados de *Bacteria* (82 %) corresponde ao filo *Proteobacteria*. Segundo Madigan (2010), as Proteobactérias constituem a maior divisão de *Bacteria* e compreendem, inclusive, vários procariotos comuns em solo e água, além de

espécies que vivem sobre ou no interior de vegetais, provocando ou não doenças. São membros de *Proteobacteria* a maioria das bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre conhecida, como espécies de *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Azoarcus*, *Azovibrio*, *Azospira*, *Azonexus*, *Derxia*, *Pseudomonas* e *Pseudomonadas* (*Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Zyomomonas*, *Gluconacetobacter*, *Commamonas* e *Ralstonia*), o que provavelmente justifica a dominância desse filo entre os isolados.

Outros três filos de maior ocorrência foram *Firmicutes* (6,6 %), *Bacteroidetes* (3,3 %) e *Planctomycetes* (3,3 %). Estes organismos são encontrados em vários habitats e frequentemente em solos. Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, representantes mais comuns do filo *Firmicutes*, apresentam desenvolvimento rápido quando há nutrientes em quantidade suficiente, no entanto, prevalecem somente quando existem condições de disponibilidade de nutrientes em áreas com baixa competição. Desse modo podem ser encontrados frequentemente em ambientes instáveis que estejam passando por transição (ATLAS; BARTHA, 1997). As bactérias do filo *Bacteroidetes* são conhecidas por apresentar características quimiorganotróficas capazes de degradar vários polímeros tais como: celulose, quitina e pectina (REICHENBACH, 1993; KIRCHMAN, 2002). O filo *Planctomycetes* consiste em onze gêneros (*Pirellula*, *Rhodopirellula*, *Blastopirellula*, *Planctomyces*, *Gemmata*, *Isosphaera*, *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxoglobus* e *Jettenia asiática*) que são conhecidos, principalmente, por sua atividade ANAMMOX (do inglês anaerobic ammonium oxidation – oxidação anaeróbica de amônio), convertendo amônio e nitrito, simultaneamente, em nitrogênio gasoso (SCHEEREN et al., 2011). No Brasil, os filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* foram identificados em solos utilizados para agricultura (tomates, feijão, milho e soja) (PEREIRA et al., 2006) e solos de floresta nativa e de plantio de eucalipto (SILVEIRA et al., 2006).

A diversidade diazotrófica dos isolados foi analisada utilizando o programa DivEs (Diversidade des Espécie v2.0) (RODRIGUES, 2005) através do índice de Shannon-Wiener, um índice sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (ATLAS; BARTHA, 1997). Avaliou-se a diversidade microbiana da comunidade diazotrófica entre os experimentos com diferentes tipos solos e entre os tratamentos, conforme descrito nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** – Análise de diversidade dos isolados diazotróficos entre os tipos de solos avaliados neste estudo.

Solos <sup>1</sup>	Índice de Shannon-Wiener (H')
Solo Agrícola 1	0,72
Solo Agrícola 2	1,14
Solo de Gramado	1,10
Solo de Floresta	0,50

<sup>1</sup>Conforme Tabela 1.

Os resultados da Tabela 5 revelam que os experimentos com o solo agrícola 2 (área de pousio pós cultivo de milho) e com solo de gramado apresentaram maior diversidade microbiana seletiva culturável ( $H' = 1,14; 1,10$ ; respectivamente), justificado, possivelmente, pelo uso de uma gramínea como planta-isca que levou ao enriquecimento da comunidade microbiana específica presente nestes tipos de solo. Segundo Asuming-Brempong (2008), o carbono sequestrado pelo solo em pousio favorece a biodiversidade e a atividade da comunidade microbiana, influenciando principalmente, populações de proteobactérias e actinobactérias. Por outro lado, no solo agrícola 1 (rotação de culturas: timbó/horticultura), onde não houve cultivo precedente de gramíneas, e no solo de floresta, onde o estabelecimento de gramíneas é inexistente, obteve-se os menores índices de diversidade ( $H' = 0,72; 0,50$ ; respectivamente). Estes resultados corroboram o fato de que comunidades microbianas estabelecidas em determinadas áreas são influenciadas, principalmente, pela vegetação nativa (HARTMANN et al., 2009).

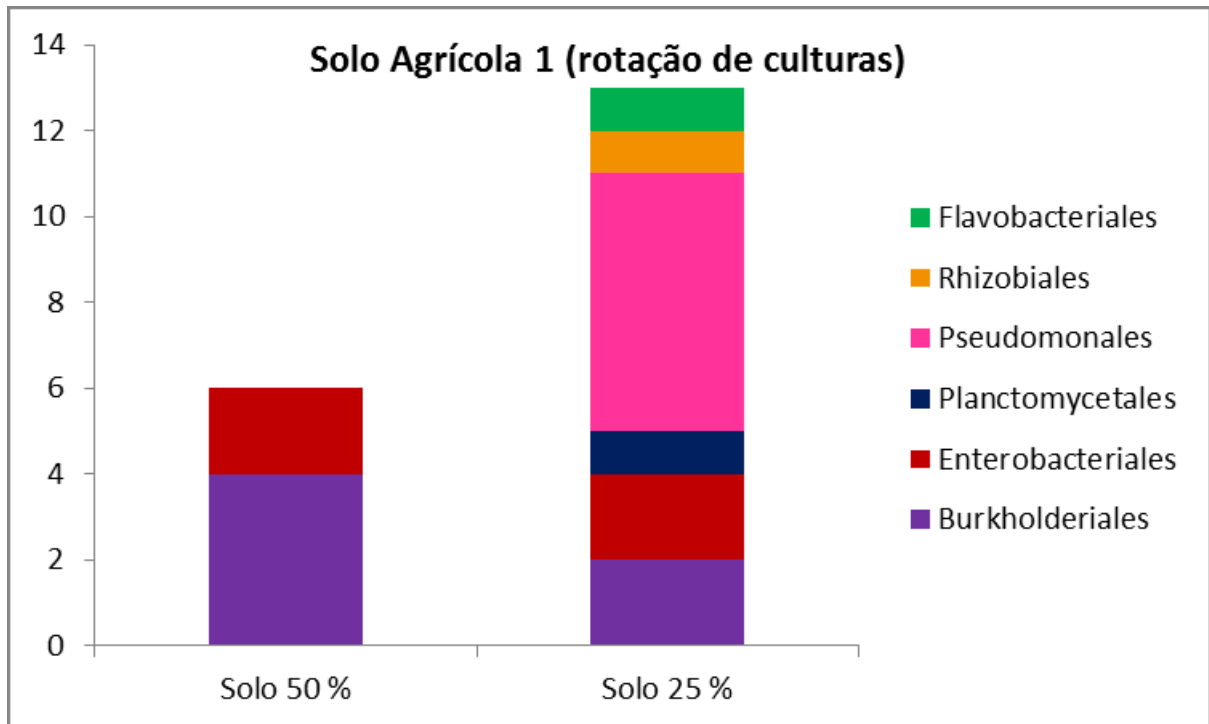
**Tabela 6** – Análise de diversidade dos isolados diazotróficos entre os tratamentos experimentados.

Tratamento <sup>1</sup>	Índice de Shannon-Wiener (H')		
	Solo (100 %)	Solo (50 %)	Solo (25 %)
Solo Agrícola 1	N.D. <sup>2</sup>	0,44	0,66
Solo Agrícola 2	0,60	0,75	0,50
Solo de Gramado	0,99	0,28	0,48
Solo de Floresta	0,28	0,24	0

<sup>1</sup>Conforme Tabela 1; <sup>2</sup>N.D. = Não determinado (este tratamento não possui isolados).

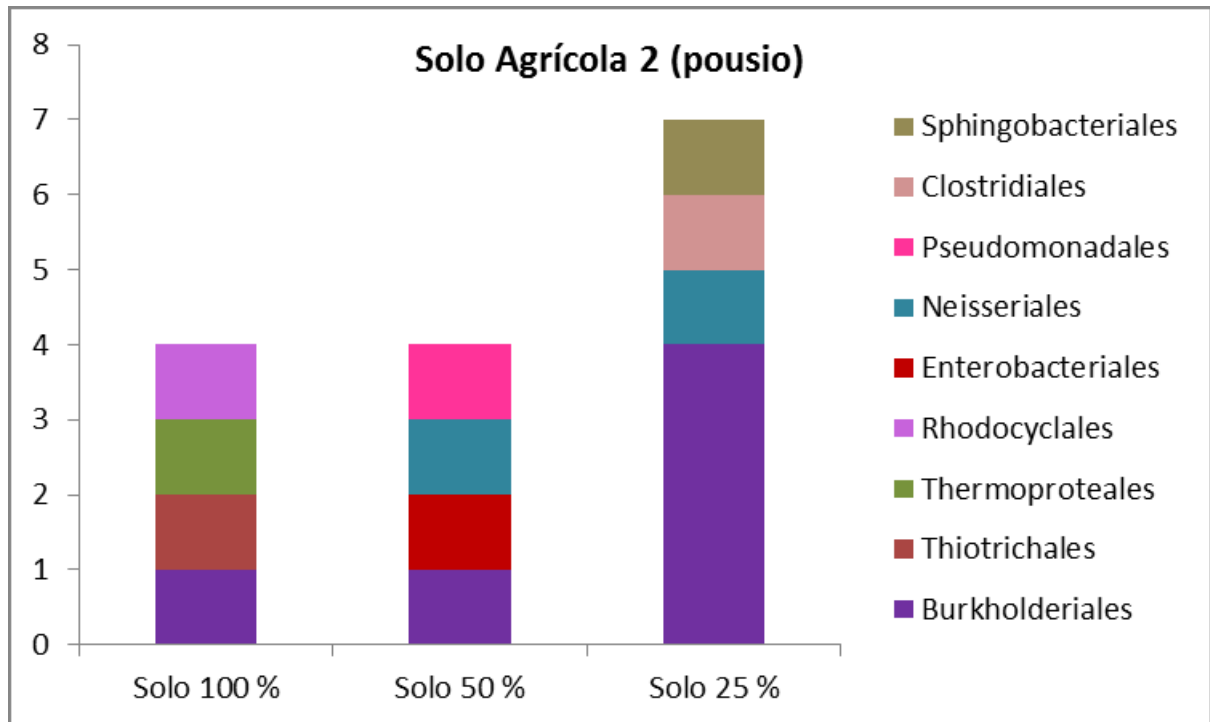
Com relação à diversidade analisada entre os tratamentos, nota-se elevado índice de Shannon Wiener ( $H' = 0,99$ ) em solo de gramado (100%) com a identificação de 16 Ordens. As Figuras abaixo apresentam a diversidade microbiana encontrada entre os isolados.

**Figura 5** – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho cultivado no solo agrícola 1 em nível de Ordem.



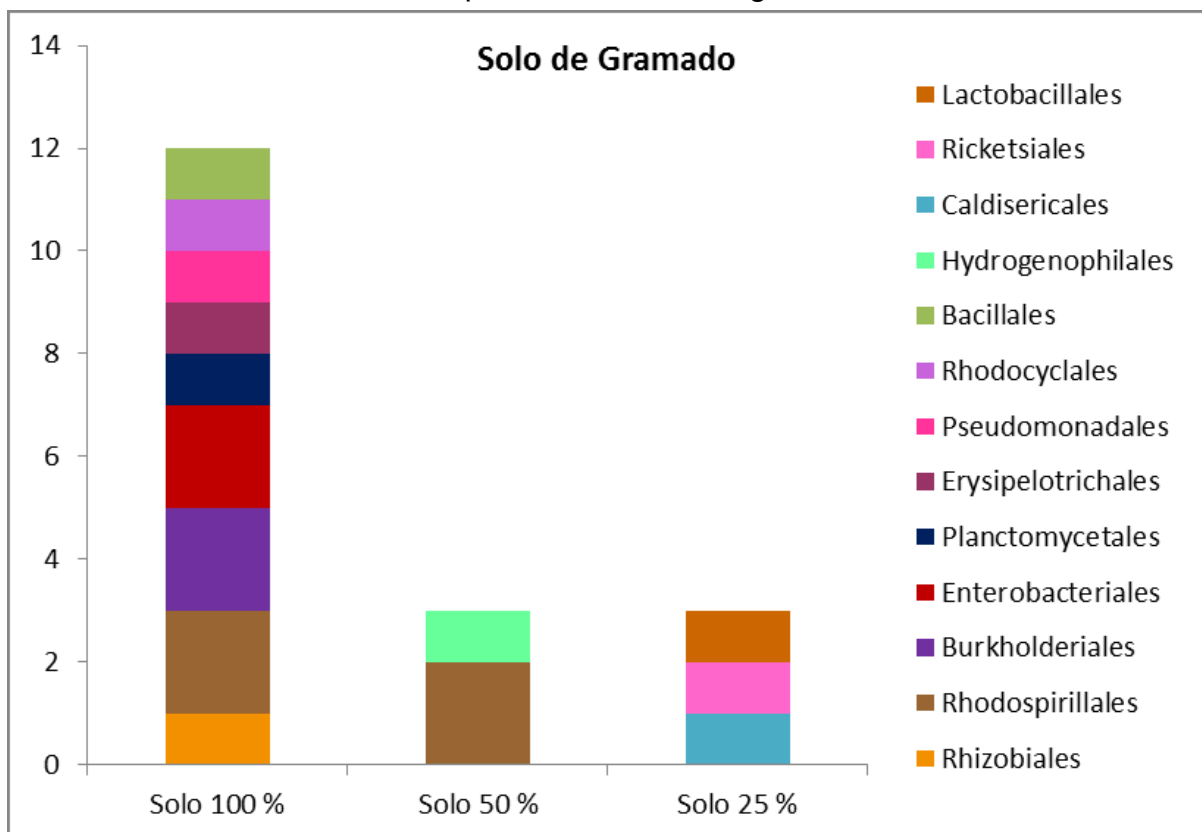
Fonte: a autora (2013).

**Figura 6** – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho cultivado no solo agrícola 2 (área de pousio) em nível de Ordem.



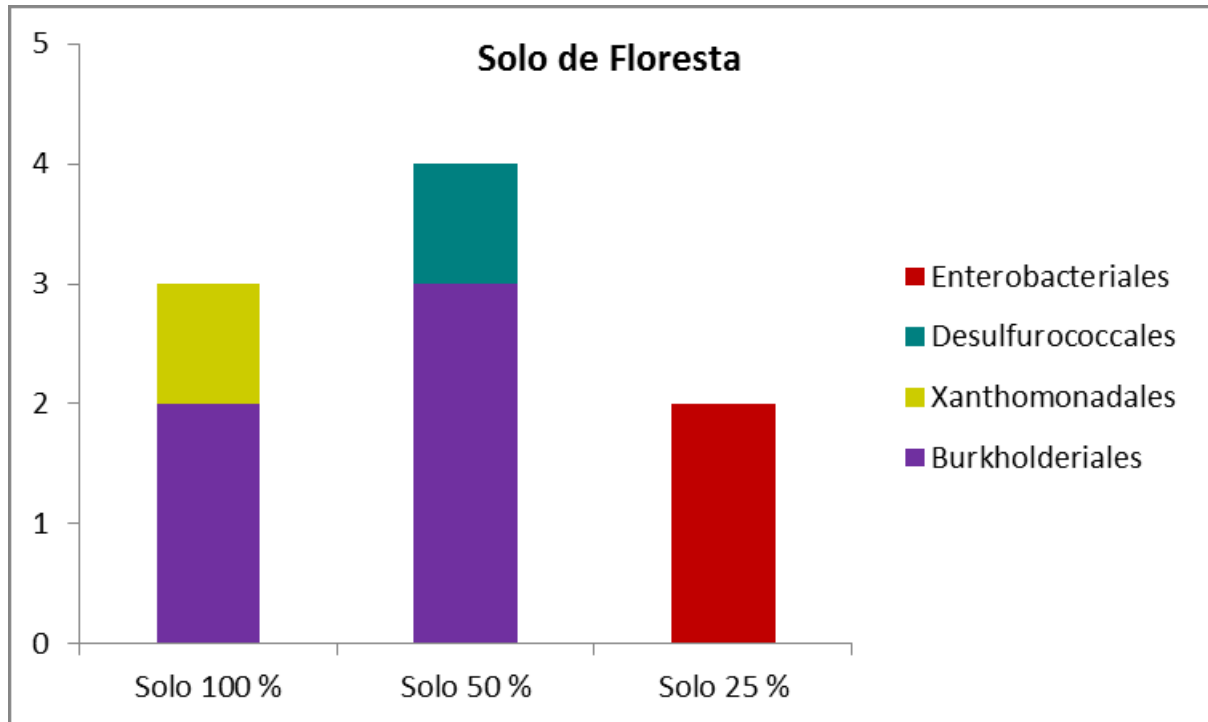
Fonte: a autora (2013).

**Figura 7** – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho submetido ao plantio com solo de gramado em nível de Ordem.



Fonte: a autora (2013).

**Figura 8** – Distribuição da diversidade microbiana diazotrófica isolada de raízes de milho submetido ao plantio com solo de floresta em nível de Ordem.



**Fonte:** a autora (2013).

Representantes de *Burkholderiales* e *Enterobacteriales* foram isolados em todos os solos experimentados, e incluem espécies de ocorrência natural em solos e água (BREED et al., 1957). Os resultados possibilitaram a identificação de comunidades específicas isoladas dentro de um experimento (tipo de solo), as quais não foram encontradas nos demais solos experimentados. Com exceção do experimento com solo agrícola 1, onde não obtiveram-se isolados no solo 100 % devido a compactação, os demais experimentos puderam ser comparados: Solo Agrícola 2 – *Shingobacteriales*, *Clostridiales*, *Neisseriales*, *Thermoproteales* e *Thitrichales*; Solo de Gramado: *Lactobacillales*, *Ricktsiales*, *Caldisericales*, *Hydrogenophilales*, *Bacillales*, *Erysipelotrichales*; Solo de Floresta – *Desulfurococcales*, *Xanthomonadales*. Estes relatos corroboram a ideia, descrita por Marschner e colaboradores (2001), de que o tipo de solo exerce grande influência sobre a microbiota rizosférica do milho. Além disso, a diluição dos solos em areia estéril permitiu o isolamento de estirpes que não foram encontradas em solo sem diluição (Tabela 7). Este fato concorda com os relatos de Bala e colaboradores (2001) e Handley e colaboradores (1998) de que a diluição dos solos em areia

permite o acesso a isolados relevantes para emprego biotecnológico, que, possivelmente encontravam-se em menor número na rizosfera.

**Tabela 7** – Distribuição dos isolados encontrados em tratamentos com solos diluídos (ao nível de Ordem) que não foram isolados em solo sem diluição.

Solo	Tratamento	Isolado (Ordem)
Agrícola 2	Solo 50 %	<i>Neisseriales</i>
		<i>Neisseriales</i>
	Solo 25 %	<i>Clostridiales</i>
		<i>Sphingobacteriales</i>
Gramado	Solo 50 %	<i>Hydrogenophilales</i>
		<i>Caldisericales</i>
	Solo 25 %	<i>Rickettsiales</i>
		<i>Lactobacillales</i>
Floresta	Solo 50 %	<i>Desulfurucoccales</i>

Por outro lado, algumas comunidades desapareceram com a diluição dos solos em areia e outras prevaleceram mesmo em solo diluído: em solo agrícola 2, comunidades de *Rhodocyclales* e *Tiotrichales* desapareceram e *Burkholderiales* prevaleceu em todos os tratamentos; em solo de gramado, excluindo-se *Burkholderiales* encontrada em solo 50 %, todas as outras comunidades (*Rhodocyclales*, *Erysipelotrichales*, *Pseudomonadales*, *Enterobacteriales* e *Rhizobiales*) não foram isoladas em solos diluídos; *Burkholderiales*, achada em solo de floresta 100 %, também foi isolada em solo 50 %, enquanto que *Xanthomonadales* desapareceu com as diluições do solo.

A análise da diversidade bacteriana encontrada no solo de Gramado (100 %), onde obteve-se o maior índice de Shannon-Wiener ( $H' = 0,99$ ), mostra que comunidades de *Rhodospirillales*, *Burkholderiales* e *Enterobacteriales*, pertencentes ao filo *Proteobacteria*, prevaleceram neste tratamento, representando as classes de alfa, beta e gama-proteobactérias, respectivamente. Dentro da ordem *Rhodospirillales* pode-se encontrar gêneros muito estudados por realizar a FBN especialmente em gramíneas, como *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*. Espécies de *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Alcaligenes* são

encontradas na ordem *Burkholderiales*, organismos bem reportados também com relação à FBN associativa. Microrganismos dos gêneros *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoeae* e *Serratia* são pertencentes à ordem *Enterobacteriales* (REIS; TEIXEIRA, 2005).

Buscando a diversidade total de bactérias associadas à superfície e ao interior das raízes de milho, através da análise do gene 16S RNAr, Chelius e Triplett (2001) reportaram a dominância de alfa-proteobactérias, principalmente dos gêneros *Rhizobium* e *Herbaspirillum*, comumente identificados em solos. Os filos *Crenarchaea* e *Euryarchaea*, pertencentes ao domínio *Archea*, foram descritos em menor grau.

O predomínio de proteobactérias associadas às raízes de milho foi também relatado por Chauhan e colaboradores (2011) em estudo baseado em técnica independente de cultivo. Os autores descrevem ainda, a ocorrência dos filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Deinococcus-Thermus*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* e *Cyanobacteria*.

A diversidade bacteriana diazotrófica culturável associada à raízes de milho que cresceram em três diferentes solos da França foi pesquisada por Berge e colaboradores (2001). O gênero *Azospirillum*, frequentemente descrito como um importante diazotrófico associado à rizosfera de milho, não foi isolado neste estudo, enquanto a população de *Bacillus circulans* prevaleceu em um dos solos pesquisados. Espécies de *Klebsiella terrigena* e *Pseudomonas* sp mostraram-se dominantes na comunidade microbiana dos outros dois solos.

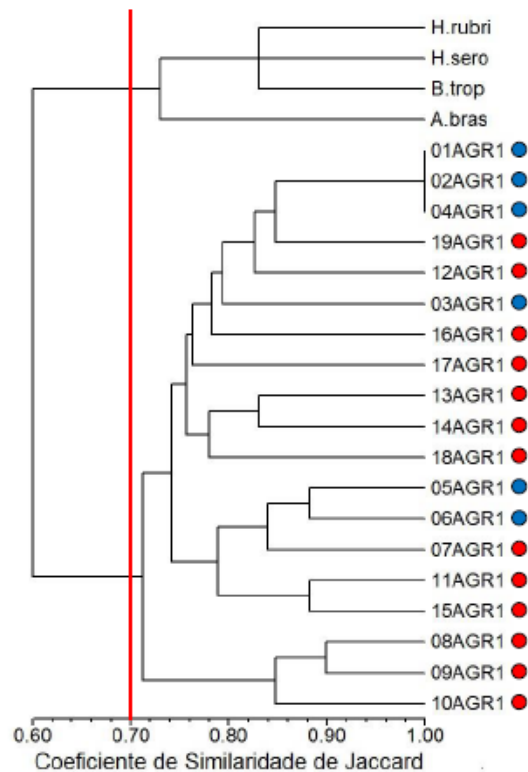
Os resultados sobre a biodiversidade específica culturável apresentados neste trabalho que teve como princípio a utilização da armadilha fisiológica para seleção de estirpes associadas às raízes de milho, corroboram a ideia de que a armadilha fisiológica, onde diluiu-se os solos experimentados em areia estéril, se mostrou eficaz para o isolamento de estirpes diazotróficas com potencial para o crescimento de plantas que, provavelmente, encontravam-se em baixas populações nos solos. Estes microrganismos podem ter tido seu crescimento inibido por comunidades bacterianas numericamente maiores, já que não foram encontrados em solos sem diluição.

### 5.2.1 Análise da Diversidade Bacteriana por BOX-PCR

A análise de BOX-PCR foi realizada com 63 isolados associados às raízes de milho. A diversidade genética e a obtenção de OTUs (unidades taxonômicas operacionais) foram avaliadas pela análise comparativa entre os padrões gerados pela amplificação de regiões conservadas e repetitivas do DNA genômico. As análises foram obtidas a partir do programa NTSYS-pc versão 2.1 (Applied Biostatistics) e encontram-se na forma de dendogramas.

Os resultados de *fingerprinting* obtidos pela técnica de BOX-PCR dos isolados obtidos a partir de plantas de milho crescidas em solo agrícola 1 (Figura 9) revelaram alta variabilidade entre as linhagens (coeficiente de similaridade de Jaccard superior a 70 %) e a presença de um grupo clonal, constituído por três indivíduos isolados no tratamento com solo 50 % isolados em meios semi-seletivos diferentes: 1AGR1 (NFb), 2AGR1 (JMV) E 4AGR1 (LGI-P); os quais foram identificados como pertencentes à Ordem *Burkholderiales*.

**Figura 9** – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo agrícola 1.



**Fonte:** a autora (2013).

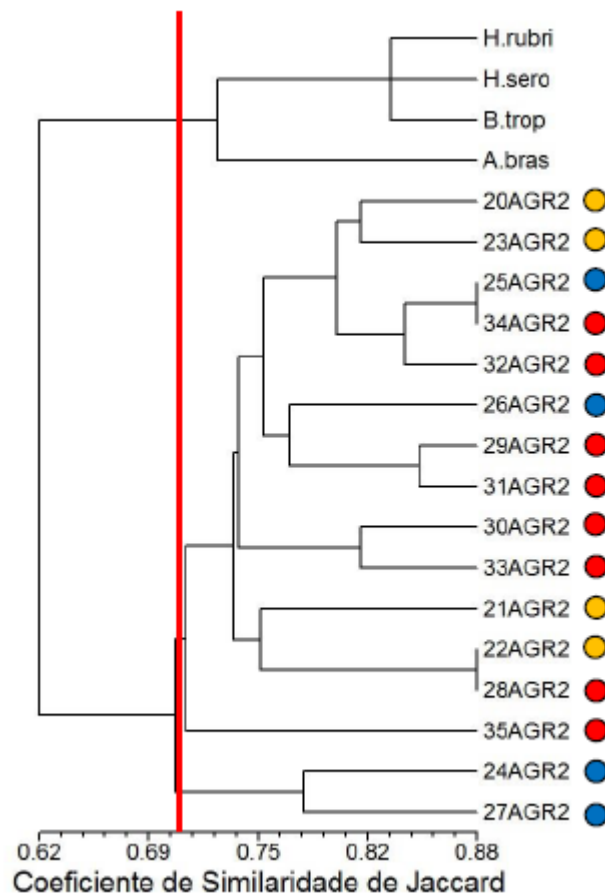
\*Estirpes padrões: H.rubri (*H. rubribalbicans*); H.sero (*H. seropedicae*); B.tro (*B. tropica*); A.bras (*A. brasilense*).

● Isolados em Solo 50 %; ● Isolados em Solo 25 %.

O sequenciamento do gene 16S RNAr é amplamente empregado na determinação de relações evolutivas, porém, é limitado ao identificar similaridade entre os organismos, pois trata da amplificação de uma região muito pequena do DNA (NAYAK et al., 2011). A técnica de BOX-PCR é um método reconhecido internacionalmente para a caracterização de estirpes que consiste na amplificação de regiões repetitivas e conservadas do genoma, geralmente localizadas no espaço intergênico, resultando em produtos de diferentes tamanhos que geram um *fingerprinting* genômico individual das estirpes bacterianas (VERSALOVIC, 1991, 1994). Dessa forma, o polimorfismo gerado com BOX-PCR permite distinguir diferentes estirpes dentro da mesma espécie com maior sensibilidade que o sequenciamento do gene 16S RNAr (NAYAK et al., 2011).

A presença de dois grupos clonais foi observada na análise de polimorfismo de BOX-PCR com os isolados das plantas cultivadas no solo agrícola 2 (Figura 10). Um grupo clonal foi formado por indivíduos isolados em tratamentos diferentes e meios semi-seletivos iguais (JMV): 25AGR2 e 34AGR2, filogeneticamente enquadrados como pertencentes às Ordens *Neisseriales* e *Burkholderiales*, respectivamente; o outro grupo foi composto pelos isolados 22AGR2 e 28AGR2, crescidos em meios JNFb e LGI-P e identificados como das Ordens *Termoproteales* e *Clostridiales*, respectivamente. Nota-se no geral, com exceção dos grupos clonais, que os indivíduos mais próximos foram isolados dentro do mesmo tratamento. A taxa de similaridade foi superior a 70%.

**Figura 10** – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo agrícola 2.



**Fonte:** a autora (2013).

\*Estirpes padrões: H.rubri (*H. rubribalbicans*);  
H.sero (*H. seropedicae*); B.tro (*B. tropica*); A.bras  
(*A. brasilense*).

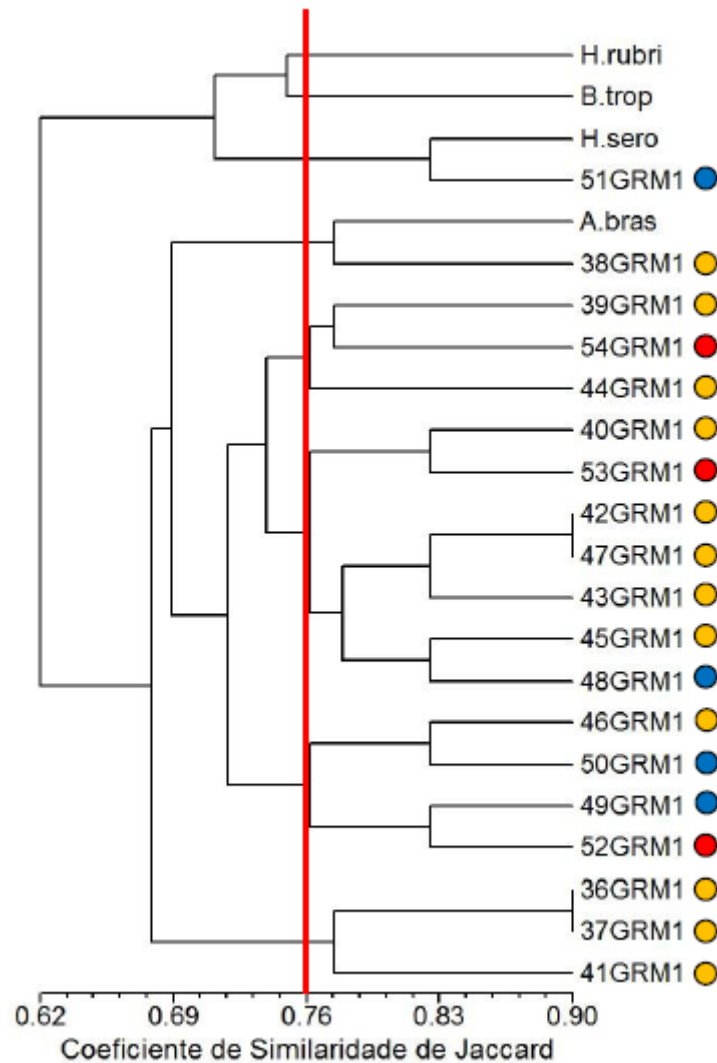
● Isolados em Solo 100%;

● Isolados em Solo 50%;

● Isolados em Solo 25%.

Com aproximadamente 76 % de similaridade, foram obtidas onze possíveis OTUs (Figura 11) isoladas nos tratamentos com solo de gramado caracterizando elevada diversidade entre as estirpes. Houve a presença de dois grupos clonais, sendo os quatro indivíduos isolados no mesmo tratamento (solo 100 %), porém com filogenia e oriundos de meios semi-seletivos diferentes: o primeiro grupo foi formado pelos isolados 42GRM1 (*Erysipelotrichales* – JMV) e 47GRM1 (*Bacillales* – NFb); as estirpes 36GRM1 (*Rhizobiales* – LGI) e 37GRM1 (*Rhodospirillales* – JNFb) foram as representantes do segundo grupo clonal. O isolado 51GRM1 (*Hydrogenophilales*) apresentou grande similaridade com a estirpe padrão *H. seropedicae*.

**Figura 11** – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo de gramado.



**Fonte:** a autora.

\*Estirpes padrões: H.rubri (*H. rubribalbicans*); H.sero (*H. seropedicae*); B.tro (*B. tropica*); A.bras (*A. brasiliense*).

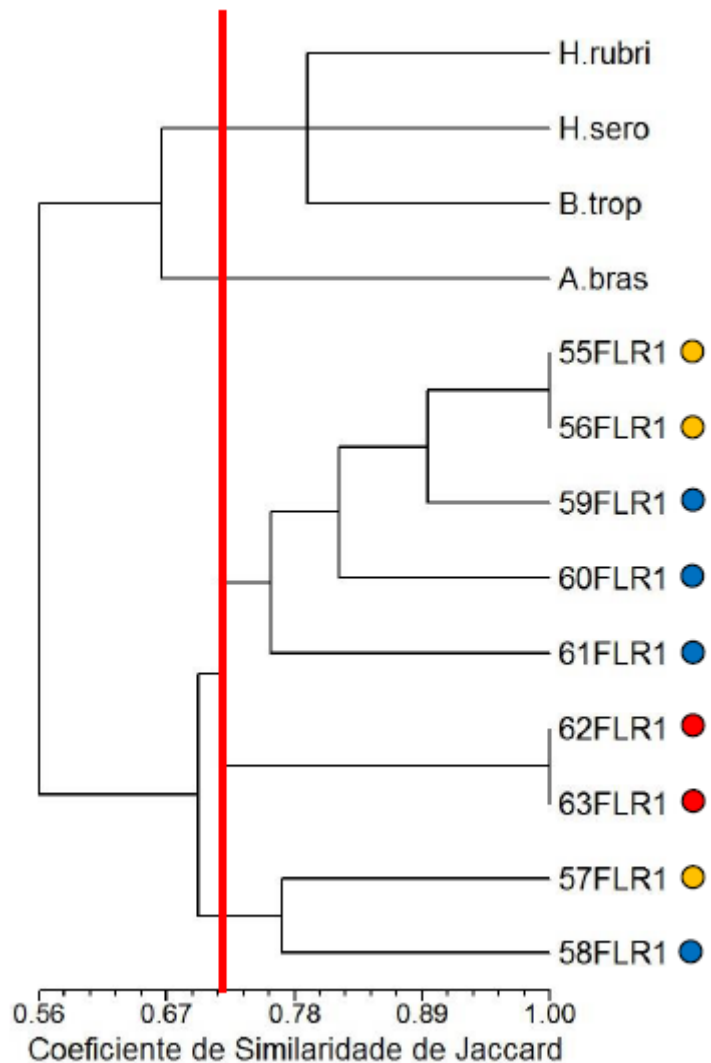
● Isolados em Solo 100%;

● Isolados em Solo 50%;

● Isolados em Solo 25%.

Nenhum isolado do experimento com solo de floresta apresentou similaridade genética polimórfica com as estirpes padrões, porém o coeficiente de similaridade de Jaccard foi superior a 70 %. Dois grupos clonais foram formados com indivíduos isolados no mesmo tratamento e filogeneticamente identificados como pertencentes à mesma Ordem: 55FLR1 (JNFb) e 56FLR1 (LGI) – *Burkholderiales*; 62FLR1 (JNFb) e 63FLR1 (JNFb) – *Enterobacteriales* (Figura 12).

**Figura 12** – Dendograma de similaridade genética das estirpes bacterianas isoladas nos tratamentos com solo de floresta.



**Fonte:** a autora (2013).

\*Estirpes padrões: H.rubri (*H. rubribalbicans*); H.sero (*H. seropedicae*); B.tro (*B. tropica*); A.bras (*A. brasilense*).

● Isolados em Solo 100%;

● Isolados em Solo 50%;

● Isolados em Solo 25%.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

O comportamento bioquímico dos 63 isolados diazotróficos foi avaliado através da quantificação de AIA, produção das enzimas líticas amilase, celulase e protease, solubilização de fosfatos e pela atividade antagonista ao fungo *Fusarium* sp. Os resultados, demonstrados na Tabela 8, referem-se aos somatórios dos valores arbitrários atribuídos às análises realizadas, onde 3 foi considerado

como excelente produção, 2 como boa produção, 1 como produção ruim e 0 como de pouca ou nenhuma produção. Os índices de AIA das estirpes padrões serviram como referência para a atribuição dos valores arbitrários das análises dos isolados, já que o AIA, assim como outros fitormônios, estimulam o crescimento de plantas apenas dentro de uma faixa estreita de concentração. Fora dessa faixa benéfica, as concentrações mais baixas são ineficazes e as mais elevadas, tóxicas (BISWAS et al., 2000). Para as demais determinações bioquímicas, considerou-se que as maiores produções representariam o melhor desempenho relacionado à promoção do crescimento vegetal, pois não há relatos na literatura quanto aos níveis satisfatórios destes compostos (excluindo-se a atividade antagonista) influenciando o desenvolvimento de plantas.

**Tabela 8** – Perfil bioquímico dos isolados e padrões exibindo a produção de auxinas (aux/ptn), de enzimas líticas (amilase, celulase e protease), solubilização de fosfatos e atividade antagonista ao fungo *Fusarium* sp pelo somatório dos valores arbitrários atribuídos às análises.

		Auxina/Proteína <sup>a</sup>				Amilase <sup>b</sup>				Celulase <sup>c</sup>				Protease <sup>d</sup>				Solubilização de P <sup>e</sup>				Antagonismo <sup>f</sup>			
		3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Padrões		4	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	1	1	1	-	3	-	
Nº de isolados por solo	Solo Agrícola 1 (Ag 1)	1	-	18	-	-	-	2	-	-	-	-	2	8	3	-	-	3	7	2	4	3	10	2	
	Solo Agrícola 2 (Ag 2)	9	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	4	-	-	2	9	3	7	-	6	3	
	Solo de Gramado (Gra)	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	2	-	-	6	6	4	14	5	-	-	
	Solo de Floresta (Flo)	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	3	5	-	5	1	3	-	
Total		10	0	53	0	0	0	2	0	0	0	0	2	24	10	0	0	14	27	9	30	9	19	5	
Nº de isolados por tratamento	Solo Ag 1 (100 %)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Solo Ag 1 (50 %)	1	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	1	2	-	1	-	5	-	
	Solo Ag 1 (25 %)	-	-	13	-	-	-	2	-	-	-	-	-	6	3	-	-	2	5	2	3	3	5	2	
	Solo Ag 2 (100 %)	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	1	2	-	1	-	2	1	
	Solo Ag 2 (50 %)	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	4	-	2	-	2	-	
	Solo Ag 2 (25 %)	4	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	1	3	3	4	-	2	2	
	Solo Gra (100 %)	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2	-	-	2	6	2	10	2	-	-	
	Solo Gra (50 %)	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	-	1	2	2	-	-	
	Solo Gra (25 %)	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	2	-	1	2	1	-	-	
	Solo Flo (100 %)	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2	-	1	1	1	-	
	Solo Flo (50 %)	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	3	1	-	2	-	2	-	
	Solo Flo (25 %)	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	
Total		10	0	53	0	0	0	2	0	0	0	0	2	24	10	0	0	14	27	9	30	9	19	5	

<sup>a</sup>Nota 3 - 1 a 2 mgAIA/mg proteína; nota 2 - 0,5 a 1 mgAIA/mg proteína; nota 1 – maior que 2 mgAIA/mg proteína; e nota 0 – menor que 0,5 mgAIA/mg proteína. <sup>b</sup>I.E.: diâmetro do Halo de solubilização/diâmetro da colônia; nota 3 – I.E maior que 4; nota 2 – I.E. de 2 a 3,9; nota 1 – I.E. de 1 a 1,9; e nota 0 – I.E. de 0 a 0,9. <sup>c</sup>Nota 3 – I.E. maior que 1,5; nota 2 – I.E. de 1 a 1,4; nota 1 – I.E. de 0,5 a 0,9; e nota 0 – I.E. menor que 0,5. <sup>d</sup>Nota 3 – I.E. maior que 5; nota 2 – I.E. de 3 a 4,9; nota 1 – I.E. de 1,5 a 2,9; e nota 0 – I.E. menor que 1,5. <sup>e</sup>Nota 3 – I.E maior que 5; nota 2 – I.E. de 3 a 4,9; nota 1 – I.E. de 1,5 a 2,9; e nota 0 – I.E. menor que 1,5. <sup>f</sup>Raio de inibição (cm); nota 3 – maior que 4 cm; nota 2 - de 3 a 3,9 cm; nota 1 de 1 a 2,9 cm; e nota 0 – menor que 0,9 cm

A relação média de auxina/proteína (mg/mg) encontrada nos padrões foi de 1,6. A grande maioria dos isolados apresentou produção bastante elevada de AIA (relação média Auxina/Proteína de 3,05) quando comparada aos padrões, sendo classificados, de modo arbitrário, em nível 1 de pontuação. Dos 63 isolados, apenas 10 tiveram produção do fitormônio equivalente à dos padrões (nível 3 de pontuação – Auxina/Proteína = 1 a 2 mg/mg), sendo 1 estirpe proveniente do tratamento com solo agrícola 1 50 % e 9 estirpes isoladas em plantas de milho submetidas ao plantio com solo agrícola 2, dentro dos diferentes tratamentos. Bactérias pertencentes à Ordem *Burkholderiales* mostraram dominância para a produção satisfatória de AIA (Tabela 9). Nenhum isolado em solos de gramado e de floresta apresentou índices de AIA análogos aos dos padrões.

**Tabela 9** – Isolados de produção de AIA equivalente aos padrões.

Isolado	Solo	Tratamento	Ordem	IE* Aux/Proř (mg/mg)
2AGR1	Agrícola 1	Solo 50 %	<i>Burkholderiales</i>	1,97
20AGR2			<i>Burkholderiales</i>	1,82
22AGR2		Solo 100 %	<i>Thermoproteales</i>	1,90
23AGR2			<i>Rhodocyclales</i>	1,90
25AGR2	Agrícola 2	Solo 50 %	<i>Neisseriales</i>	1,69
27AGR2			<i>Burkholderiales</i>	2,00
30AGR2		<i>Neisseriales</i>	1,72	
31AGR2		Solo 25 %	<i>Burkholderiales</i>	1,79
32AGR2			<i>Burkholderiales</i>	1,66
34AGR2			<i>Burkholderiales</i>	1,79

\*IE: Índice Enzimático.

O AIA é um dos principais fitormônios produzidos por bactérias responsáveis pelo efeito estimulatório observado no crescimento de plantas (TROMAS; PERROT-RECHENMANN, 2010; SIMON; PETRÁSEK, 2011). Vários experimentos com estirpes do gênero *Azospirillum* foram realizados e mostraram potencial em promover crescimento de plantas em diferentes solos e condições climáticas (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

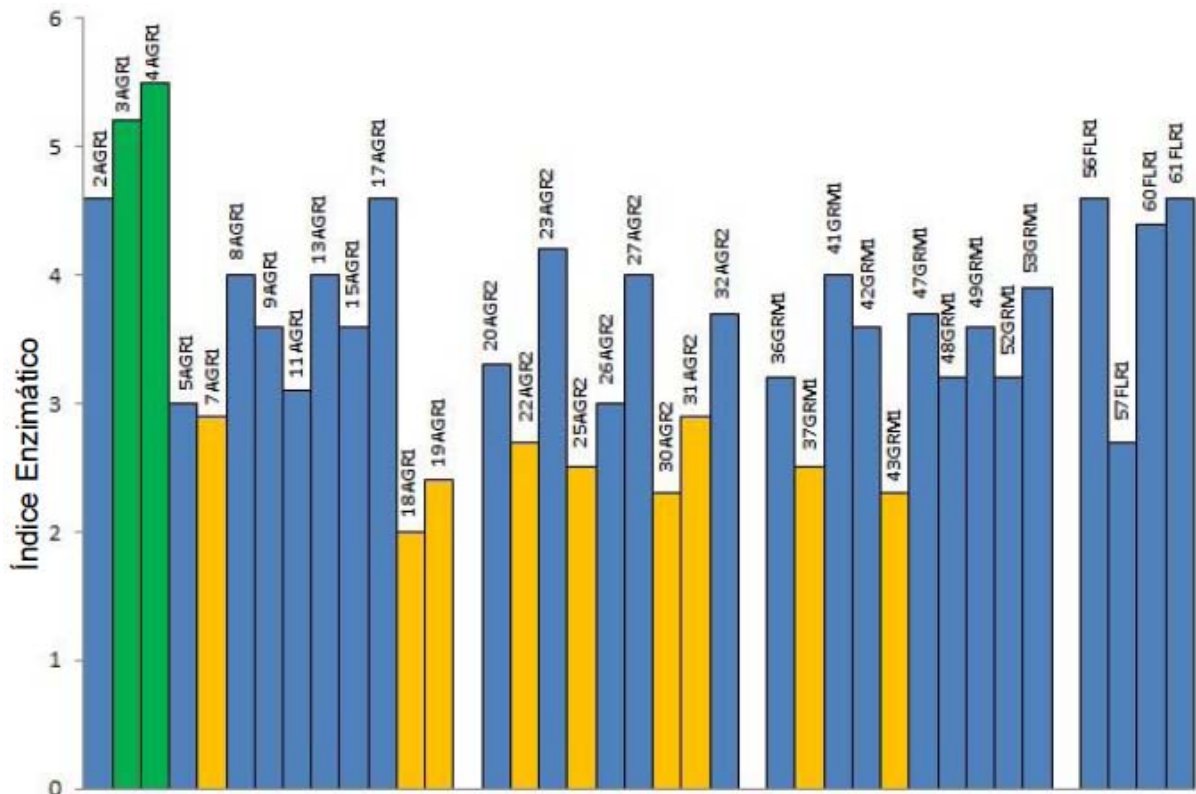
Em 2004, Radwan e colaboradores quantificaram a produção de AIA por estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio (*Azospirillum brasilense* Cd, A.

*lipoferum* Br17, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *H. rubrisubalbicans* M4 e *Herbaspirillum* sp) e avaliaram o efeito da inoculação destas estirpes em plântulas de milho e trigo. *In vitro*, as estirpes testadas mostraram produção linear (até 200  $\mu$ M) de indóis relacionado à concentração de triptofano. A inoculação de todas as estirpes nas duas gramíneas promoveu o alongamento radicular das plantas. Hernandez-Rodriguez e colaboradores (2008) também observaram o efeito do fitormônio no aumento do comprimento radicular em plantas de milho produzido pela espécie *Pseudomonas fluorescens*.

Trabalhando com *Bacillus*, Araújo e Guerreiro (2010) constataram que a maioria dos isolados promotores do crescimento do milho não correspondia aos maiores níveis de produção de AIA. O efeito inibitório do fitormônio foi relatado também por Sarwar e Kremer (1995) ao comparar a produção de auxinas entre bactérias promotoras e inibidoras do crescimento, verificando que as últimas produziram altos níveis e inibiram o crescimento da raiz de *Convolvulus arvensis*.

Em relação à atividade enzimática, nenhum isolado e nenhuma estirpe padrão apresentou produção da enzima celulase e apenas dois isolados foram produtores de amilase, os quais foram obtidos no tratamento com solo agrícola 1 (25 %): 18AGR1 (*Flavobacteriales*) e 19AGR1 (*Enterobacteriales*), com índice enzimático para atividade amilolítica de 1,8 e 1,3, respectivamente. Aproximadamente 57 % dos isolados produziram protease (Figura 13), sendo que duas estirpes (3AGR1 e 4AGR1), isoladas em solo agrícola 1 (50 %) e identificadas como pertencentes à Ordem *Burkholderiales*, foram classificadas como ótimas produtoras. A maioria das estirpes se enquadrou dentro da faixa de atividade proteolítica de I.E. 3 a 4,9.

**Figura 13** – Distribuição dos isolados obtidos a partir da metodologia de armadilha fisiológica, quanto à atividade proteolítica.



**Fonte:** a autora (2013).

\*AGR1 = Solo Agrícola 1; AGR2 = Solo Agrícola 2; GRM1 = Solo de Gramado; FLR = Solo de Floresta. Produção de Protease (Valores Arbitrários Atribuído):

■ 3 (Índice Enzimático – IE > 5); ■ 2 (IE 3 a 4,9); ■ 1 (IE 1 a 2,9).

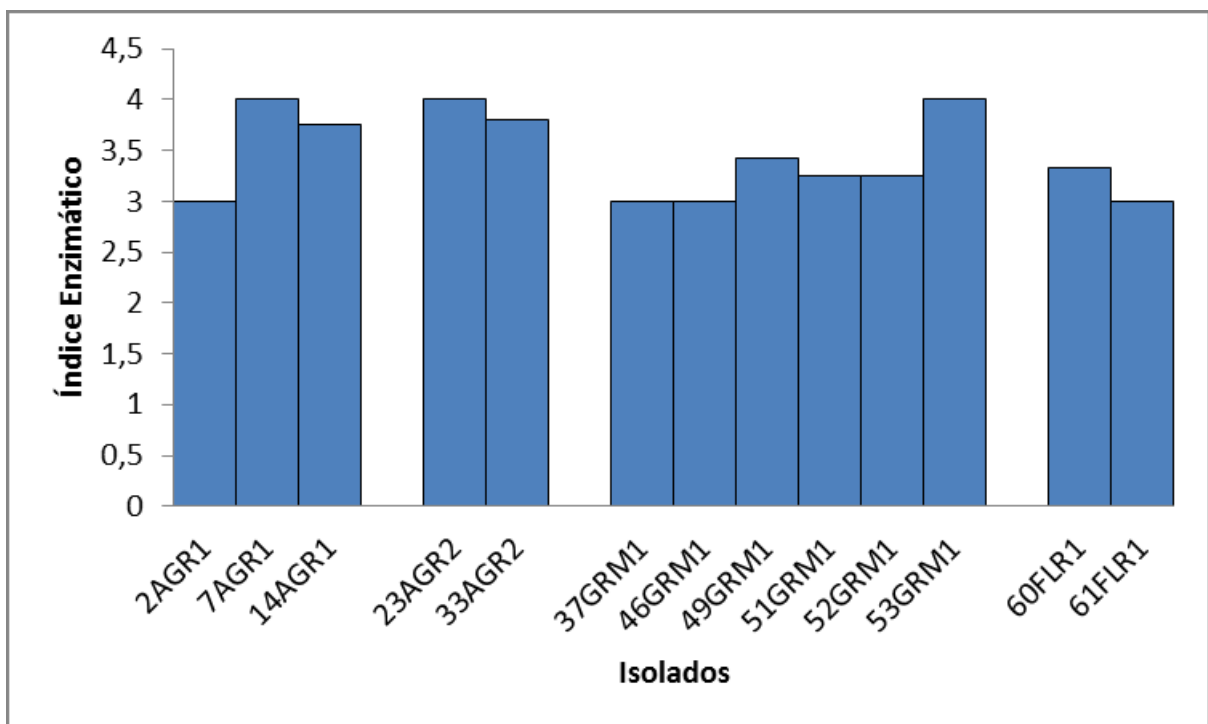
As enzimas líticas, tais como amilase, celulase e protease, são relacionadas a atividades hiperparasíticas (KIM; CHUNG, 2004), pois possuem a propriedade de degradar a matriz estrutural das paredes das células fúngicas (OPPENHEIM; CHET, 1992). As celulases podem auxiliar no mecanismo de penetração ativa da bactéria dentro da planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997). Alguns estudos descrevem a ação dessas enzimas sobre a germinação de sementes, acelerando este processo (SALES et al., 2005; AGUIAR, 2010).

A produção de enzimas líticas detectada nos isolados deste trabalho tem sido descrita como características desejáveis a bactérias capazes de promover o crescimento vegetal (KIM; CHUNG, 2004; TIAN et al., 2009; PEREIRA; CASTRO, 2010). Em 2003, Emtiazi e colaboradores obtiveram isolados de planta de milho caracterizados como fixadores de nitrogênio e que apresentavam atividade celulolítica e amilolítica, sugerindo que os mesmos podem fazer a degradação de resíduos celulose e amido para gerar energia. A produção de amilases, celulases e

proteases também foi identificada em isolados de plantas de milho por Szilagyi-Zecchin (2012).

Treze das 50 estirpes solubilizadoras de fosfatos (26 %) mostraram bons índices (I.E. 3 a 4,9), destacando a dominância dos isolados classificados como pertencente às Ordens *Burkholderiales* (2AGR1, 14AGR1, 60FLR1 E 61FLR1) e *Rhodospirillales* (23AGR2, 37GRM1, 46GRM1 e 49GRM1) (Figura 14).

**Figura 14** – Distribuição dos isolados obtidos a partir da metodologia de armadilha fisiológica classificados arbitrariamente como de alto potencial para a solubilização de fosfatos.



**Fonte:** a autora (2013).

\*AGR1 = Solo Agrícola 1; AGR2 = Solo Agrícola 2; GRM1 = Solo de Gramado; FLR = Solo de Floresta.

Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfato inorgânico (SONG et al., 2008; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; ARRUDA et al., 2013). Mas, mesmo que a diversidade de bactérias solubilizadoras de P presentes no solo seja grande, os níveis populacionais observados geralmente são baixos para que ocorra uma competição com outras bactérias comumente associadas à rizosfera. Para que a quantidade de P liberado por estes organismos seja suficiente para promover o crescimento vegetal, deve-se promover a inoculação destes organismos em

concentrações elevadas. A co-inoculação de espécies solubilizadoras de P com espécies diazotróficas pode prover uma nutrição vegetal mais equilibrada e apresentar efeitos sinérgicos na promoção do crescimento (KUNDU; GAUR, 1984; BELIMOV et al., 1995).

O controle biológico de fitopatógenos nos diferentes ecossistemas é uma ferramenta que desperta grande interesse biotecnológico devido à necessidade de se buscar alternativas viáveis ao uso de agroquímicos e dos problemas de sua utilização indiscriminada, como a contaminação ambiental, dos alimentos e dos consumidores, o aparecimento de populações resistentes de patógenos e diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; SILVA et al., 2004; VALE et al., 2010). Dentro deste cenário, os fungos são os principais microrganismos transmitidos via semente na cultura do milho, podendo provocar problemas de germinação, de emergência de plântulas e podridões radiculares e da base do colmo (SHURTLEFF, 1992). No Brasil, dentre os fitopatógenos de campo que acometem o milho, *Fusarium verticillioides* é o mais frequente (PEIXOTO et al., 1998).

Neste trabalho, 48 isolados apresentaram ótimo desempenho de antagonismo frente ao fitopatógeno *Fusarium* sp, mostrando inibição total ao fungo. Cinquenta e três isolados promoveram inibição parcial ao fungo e apenas 6 indivíduos revelaram baixa ou nenhuma atividade antagonista. Estudos têm mostrado que espécies endofíticas de milho apresentam boa capacidade antagonista ao fungo *Fusarium*, reduzindo significativamente seu crescimento (ARAÚJO; GUERREIRO, 2010; SZILAGYI-ZECCHIN, 2012).

Os agentes microbianos, por serem considerados mais seguros à saúde humana, surgem como uma alternativa viável e efetiva dentro do biocontrole (ZUCCHI; MELO, 2009), que pode ser feito de diversas maneiras: alterando as condições ambientais que possibilitam o aparecimento de pragas ou doenças; utilizando microrganismos com propriedades antagônicas aos patógenos ou parasitando as pragas. Diante disto, os microrganismos endofíticos têm a vantagem de habitar um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, direcionando o controle por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência (PEIXOTO NETO et al., 2002). O sistema de cultivo e os processos de controle biológico de pragas empregados na agricultura têm

características próprias. A atividade da agricultura ecológica é considerada o ramo da agropecuária mais promissora, com um crescimento anual de cerca de 10% (MEDEIROS et al., 2008).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS

Após inoculação das sementes do híbrido de milho 2B587HX (Dow AgroSciences) ( $10^6$  cel semente<sup>-1</sup>) pelas 63 estirpes isoladas (Tabela 10), pelas estirpes padrões e pelo controle (sobrenadante da cultura de *A. brasilense* AbV5), mensurou-se o comprimento da raiz principal após 72 horas de germinação, calculando-se a média das 20 sementes inoculadas por isolado.

**Tabela 10** – Média do comprimento da raiz principal de sementes de milho germinadas em 3 dias, submetidas à inoculação com os 63 isolados, pelas estirpes padrões e pelo tratamento controle.

Isolado	Comprimento de Raiz (Média – cm)	Isolado	Comprimento de Raiz (Média – cm)	Isolado	Comprimento de Raiz (Média – cm)
1AGR1	12,09	24AGR2	10,13	47GRM1	13,48
2AGR1	11,30	25AGR2	10,81	48GRM1	13,85
3AGR1	9,33	26AGR2	10,21	49GRM1	12,72
4AGR1	12,27	27AGR2	10,66	50GRM1	10,56
5AGR1	12,86	28AGR2	11,81	51GRM1	4,73
6AGR1	12,66	29AGR2	11,13	52GRM1	8,87
7AGR1	10,00	30AGR2	11,47	53GRM1	11,23
8AGR1	11,77	31AGR2	12,21	54GRM1	11,50
9AGR1	13,47	32AGR2	*N.D.	55FLR1	11,51
10AGR1	10,13	33AGR2	3,13	56FLR1	12,71
11AGR1	14,47	34AGR2	11,48	57FLR1	11,34
12AGR1	10,54	35AGR2	10,70	58FLR1	11,93
13AGR1	12,82	36GRM1	13,59	59FLR1	10,50
14AGR1	6,84	37GRM1	12,34	60FLR1	10,54
5AGR1	12,21	38GRM1	12,40	61FLR1	11,31
16AGR1	12,35	39GRM1	10,54	62FLR1	9,43
17AGR1	9,75	40GRM1	12,22	63FLR1	10,15
18AGR1	8,60	41GRM1	10,76	<i>H. rubribalbicans</i>	10,87
19AGR1	11,17	42GRM1	9,28	<i>H. seropedicae</i>	10,72
20AGR2	12,66	43GRM1	11,56	<i>B. tropica</i>	11,94
21AGR2	9,67	44GRM1	11,54	<i>A. brasilense</i>	12,00
22AGR2	10,77	45GRM1	9,80	Controle	9,67
23AGR2	12,81	46GRM1	10,73		

\*N.D. = Não determinado (Não houve emergência de raiz).

Mesmo que não se tenham observado efeitos significativos (baixos índices de correlação) da produção de AIA, de enzimas líticas (amilase, protease e celulase) e da solubilização de fosfatos sobre o comprimento da raiz principal, nota-se que algumas estirpes promoveram efeitos de estimulação e de inibição sobre o desenvolvimento inicial de plantas.

A estirpe 11AGR1 (pertencente à Ordem *Pseudomonadales*) isolada no tratamento com solo agrícola 1 (25 %), aumentou o comprimento da raiz principal em 50 % em relação ao controle e em 25 % em relação a média das estirpes padrões (11,38 cm). O isolado 9AGR1 (*Pseudomonadales*), 36GRM1 (*Rhizobiales*), 47GRM1 (*Bacillales*) e 48GRM1 (amostra não identificada pelo sequenciamento), promoveram aumentos de aproximadamente 39 % em relação ao controle e de 17 % em relação às estirpes padrões.

Por outro lado, alguns microrganismos reduziram significativamente a emergência da raiz principal das sementes de milho germinadas de modo total, como no caso da estirpe 32AGR2 (*Burkholderiales*), ou de modo parcial. O isolado 14AGR1 (*Burkholderiales*) mostrou redução de aproximadamente 30 % em relação ao controle e 42 % em relação às estirpes padrões. Reduções ainda maiores no comprimento da raiz principal foram observadas na inoculação das estirpes 33AGR2 (estirpe não identificada pelo sequenciamento) e 51GRM1 (*Hydrogenophilales*), com decréscimo de cerca de 60 % em relação ao controle e 66 % em relação a média das estirpes padrões. Com exceção do isolado 32AGR2, que apresentou ótima produção de AIA, as estirpes 33AGR2 e 51GRM1 mostraram elevada produção do fitormônio quando comparada às estirpes padrões. A caracterização filogenética e bioquímica, bem como o potencial promotor de crescimento de cada isolado e sua principal aplicação biotecnológica constam no APÊNDICE I.

Estudos revelam que a inoculação de BCPVs, como espécies de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter* e *Bacillus*, em sementes de milho têm mostrado resultados significativos positivos não só no processo germinativo como também no desenvolvimento das plantas e no incremento da produção de grãos (CONCEIÇÃO et al., 2009; GHOLAMI et al., 2009; SZILAGYI-ZECCHIN, 2012).

Em 2006, Das e Kole conduziram um experimento em condições de laboratório com cinco estirpes bacterianas associativas isoladas da rizosfera de arroz para investigar o efeito da inoculação conjunta de bactérias diazotróficas com estirpes que apresentavam algum outro potencial de crescimento vegetal

(solubilização de fosfato, oxidação e solubilização de enxofre). A inoculação conjunta de bactérias diazotróficas e não-diazotróficas em sementes de arroz estimulou significativamente a taxa de germinação das sementes, bem como a atividade de nitrogenase dos microrganismos presentes nas raízes e no acúmulo de matéria seca das plântulas de arroz.

Avaliando a germinação também em plântulas de arroz, Baset Mia e colaboradores (2012) inocularam quatro estirpes de BPCVs, sendo três pertencentes ao gênero *Rhizobium* sp, utilizando papel filtro e placas de Petri, que foram mantidas em estufa a 30 °C por 120 horas. Os resultados sugerem que a inoculação aumentou significativamente a emergência e vigor das plântulas, o crescimento da raiz principal, área e superfície de raiz. Entre as cepas, *Bacillus sphaericus* UPMB10 mostrou melhor desempenho em relação ao crescimento das plântulas e *Rhizobium* UPMR1006 estimulou maior emergência de raízes secundárias.

A reunião de características bioquímicas para promoção do crescimento vegetal direto ou indireto é importante, entretanto, a compatibilidade das estirpes com a planta é igualmente significativa. Neste cenário, a germinação assume importante papel, pois é decisiva para os estágios subsequentes de desenvolvimento vegetal (CASSÁN et al., 2009; MEHTA et al., 2010).

Estudos futuros serão necessários para avaliar a influência dos parâmetros bioquímicos determinados neste trabalho sobre a germinação das sementes de milho, testando, dessa forma, o potencial biotecnológico dos isolados “*in vitro*” e a campo.

## 5.5 SELEÇÃO DOS ISOLADOS PROMISSORES PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

A obtenção de isolados elite se deve à seleção de estirpes promissoras para aplicação no campo, visando a união de características desejáveis desempenhadas por esses microrganismos, como o desenvolvimento de película em meios semi-sólidos específicos (indicativo de crescimento de diazotróficos), solubilização de fosfatos, atividade antagonista, produção de auxinas e de enzimas líticas. Aliado a isso, este trabalho propôs a avaliação do desenvolvimento inicial de plântulas de milho inoculadas com os isolados obtidos, a fim de se observar a influência destes parâmetros sobre a germinação das sementes. Portanto, essa seleção objetivou destacar os isolados competentes para a maior parte dos critérios

analisados. Assim sendo, o isolado 23AGR2 (*Rhodocyclales* - obtido em solo Agrícola 2 100 %), o qual reuniu a maior quantidade de características desejáveis, se mostrou eficiente para a FBN, produção de AIA, solubilização de fosfato, atividades proteolítica e antagonista ao fungo *Fusarium* sp, além de aumentar o comprimento médio das raízes de milho em 13 % em relação a média das estirpes padrões e 32 % em relação ao tratamento controle.

Entretanto, os isolados 11AGR1 (*Pseudomonadales* – isolado em solo agrícola 1 25 %), 36GRM1 (*Rhizobiales* – isolado em solo de gramado 100 %) e 48GRM1 (não identificado pelo sequenciamento – isolado em solo de gramado 50 %), mostraram contribuições maiores na emergência de raiz principal com incremento médio de 23 % em relação à média das estirpes padrões e 45 % em relação ao tratamento controle, além de apresentar bons índices de atividades proteolítica e antagonista.

## 6 CONCLUSÕES

- A comunidade bacteriana seletiva culturável associadas às raízes de milho cultivados nos solos agrícola 2 (área de pousio pós cultivo de milho) e de gramado apresentaram maior diversidade entre espécies ( $H' = 1,14$  e  $1,10$ , respectivamente), evidenciando o fato de que bactérias nativas adaptadas ao meio (solo/planta) estabeleceram uma melhor relação com a planta-isca, que, possivelmente, enriqueceu a comunidade microbiana específica presente nestes tipos de solo.
- A caracterização filogenética identificou o Filo *Proteobacteria* de maior ocorrência entre os isolados, conhecido por agrupar a maioria das bactérias diazotróficas de vida livre conhecida.
- A armadilha fisiológica para o isolamento de bactérias diazotróficas foi eficiente para a obtenção de isolados promotores do crescimento de gramíneas, visto que a diluição dos solos em areia favoreceu o desenvolvimento de populações microbianas não encontradas em solo sem diluição como representantes das Ordens *Neisseriales*, *Clostridiales*, *Shingobacteriales*, *Hydrogenophilales*, *Ricketisiales*, *Lactobacillales* e *Desulfurucoccales*.
- As análises de polimorfismo por BOX-PCR revelaram alta diversidade entre os isolados e nenhuma similaridade com as estirpes padrões, exceto o isolado 51GRM1 que apresentou similaridade com *H. seropedicae*.
- O isolado 23AGR2 (*Rhodocyclales*) reuniu a maior quantidade de características desejáveis (FBN, índices satisfatórios de AIA, solubilização de fosfato, atividades proteolítica e antagonista ao fungo *Fusarium* sp) e incrementou o comprimento médio das raízes de milho em 13 % em relação a média das estirpes padrões e 32 % em relação ao tratamento controle.
- Os isolados 11AGR1 (*Pseudomonadales*), 36GRM1 (Rhizobiales) e 48GRM1 (não identificado pelo sequenciamento), mostraram contribuições maiores na emergência de raiz principal com incremento médio de 23 % em relação à média das estirpes padrões e 45 % em relação ao tratamento controle, além de apresentar bons índices de atividades proteolítica e antagonista.

- As quatro estirpes selecionadas neste trabalho (23AGR2, 11AGR1, 36GRM1 e 48GRM1), que apresentaram alto potencial para aplicação biotecnológica no campo para o auxílio ao desenvolvimento vegetal, foram isoladas a partir de raízes de milho submetido ao cultivo em solos diluídos, caracterizando a eficiência da metodologia proposta neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidos pelo fungo *Aspergillus niger***. 2010. 118 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001, 2013.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; AQIL, F.; WANI, A. A.; SOUSCHE, Y. S. Plant growth promoting potential of free-living diazotrophs and other rhizobacteria isolated from Northern Indian soil. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 1112-1123, 2006.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ARAUJO, F. F.; GUERREIRO, R. T. Biopreservação de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 837-844, 2010.
- ARRUDA, L.; BENEDUZI, A.; MARTINS, A.; LISBOA, B.; LOPES, C.; BERTOLO, F.; PASSAGLIA, L. M. P.; VARGAS, L. K. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.
- ASUMING-BREMPONG, S.; GANTNER, S.; ADIKU, S. G. K.; ARCHER, G.; EDUSEI, V.; TIEDJE, J. M. Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2811-2818, 2008.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology - Fundamentals and Applications**, 4 ed. [S. I.]: Addison-Wesley Pub, 1997. 306 p.
- BALA, A.; MURPHY, F.; GILLER, K. E. Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 841-843, 2001.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-83 associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911-922, 1997.

- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 433-439, 1980.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 238 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1996.
- BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; DICK, R. P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology Fertility of Soils**, v. 38, p. 15-20, 2003.
- BANCHIO, E.; BOGINO, P. C.; ZYGADLO, J.; GIORDANO, W. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 766-771, 2008.
- BANO, Q.; ILYAS, N.; BANO, A.; ZAFAR, N.; AKRAM, A.; HASSAN, F. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, p. 13-20, 2013.
- BARRA, V. R.; ROMEIRO, R. S.; FERRAZ, H. G. M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H. S. A.; MOURA, A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; MENDONÇA, H. L.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. Potencialidade antagonística em alguns procariontes agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p. 121-126, 2008.
- BARRETO, E. S.; TORRES, A. R.; BARRETO, R. M.; VASCONCELOS, A. T. R.; ASTOLFI-FILHO, S.; HUNGRIA, M. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 783-790, 2008.
- BASET MIA, M. A.; SHAMSUDDIN, Z. H.; MAHMOOD, M. Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 3758-3765, 2012.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. **Encyclopedia of Soils in the Environment**, v. 1. Oxford: Elsevier, 2005. p. 103-115.
- BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. The potencial contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, Doi: 10.1016/j.apsoil.2011.09.003, 2011.
- BAUTISTA, L. X. C.; GALLARDO, I. R. **Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) em cultivos microbianos.** 2008. 140 f. Trabalho de conclusão de curso – Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, 2008.

BELIMOV, A. A.; KOJEMIAKOV, A. P.; CHUVARLIYEVA, C. V. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, v. 173, p. 29-37, 1995.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1-13, 2009.

BERGE, O.; HEULIN, T.; BALANDEREAU, J. Diversity populations in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) growing on different French soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, p. 210-215, 2001.

BERNARDES, F. S.; PATRÍCIO, F. R. A.; SANTOS, A. S.; FREITAS, S. S. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 115-121, 2010.

BERRAQUEIRO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Pharmaceutica**, v. 17, p. 399-406, 1976.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B.; YANNI, Y. G.; ROLFE, B. G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 880-886, 2000.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, 2001.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 42, p. 241-250, 1995.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BOGNOLA, I. A.; CURCIO, G. R.; GOMES, J. B. V.; CAVIGLIONE, J. H.; UHLMANN, A.; CARDOSO, A.; CARVALHO, A. P. **Levantamento Semidetalhado de Solos do Município de Londrina**. 1. ed. Londrina: IAPAR, 2011. 100 p.

BONO, J.; RODRIGUES, A.; MAUAD, M.; ALBUQUERQUE, J.; YAMAMOTO, C.; CHERMOUTH, K.; FREITAS, M. Modo de aplicação dos fertilizantes nitrogenados na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Agrarian**, v. 1, p. 91-102, 2008.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 7 ed. EUA: Waverly Press, 1957, 1094 p.

BRUSSAARD, L.; RUITER, P. C.; BROWN, G. G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 121, p. 233-244, 2007.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279 p.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. **Tecnologias de produção do Milho**. 20. ed. Viçosa: UFV, 2004. p. 139-82.

CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 12-19, 2009.

CASTELLANOS, T.; DOHRMANN, A. B.; IMFELD, G.; BAUMGARTE, S.; TEBBE, C. C. Search of environmental descriptors to explain the variability of the bacterial diversity from maize rhizospheres across a regional scale. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 383-393, 2009.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-21, 1988.

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

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 359-366, 2010.

CHAUHAN, P. S.; CHAUDHRY, V.; MISHRA, S.; NAUTIYAL, C. S. Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, p. 15-32, 2011.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of *Archea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 252-263, 2001.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; NACAMULLI, C.; TABACCHIONI, C. Influence of plant development cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, v. 8, p. 11-18, 1998.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathology Society, 1983. 539p.

COCKING, E. C. Endophytic colonization of plants roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, v. 252, p. 169-175, 2003.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

COMPANT, S.; SESSITSCH, A.; MATHIEU, F. The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria – a tribute to M. L. V. Galippe. **Plant Soil**, v. 356, p. 299-301, 2012.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_01\\_09\\_17\\_44\\_20\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F.; CAMPOS, S. C. Germinação e vigor de sementes de milho recobertas com viabilidade de inóculo durante o armazenamento. **Ciência Agrotécnica**, v. 33, p. 765-772, 2009.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Review in Microbiology**, v. 21, p. 1-18, 1995.

CRUZ, J. C.; KOZEN, E. A.; PEREIRA FILHO, I. A.; MARRIEL, I. E.; CRUZ, I.; DUARTE, J. O.; OLIVERIA, M. F.; ALVARENGA, R. C. Importância da produção do milho orgânico para a agricultura familiar. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26, 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: ABMS/Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 213-217, 2002.

DARWIN, C. **The Power of Movement in Plants**. Londres: John Murray, 1880. 418 p.

DAS, A. C.; KOLE, S. C. Effect of some root associative bacteria on germination of seeds, nitrogenase activity and dry matter production by rice plants. **Journal of Crop and Weed**, v. 2, p. 47-51, 2006.

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DUARTE, M. W.; DAMASCENO, R. G.; SALAMONI, S. P.; OLIVEIRA, M. F.; VAN DER SAND, S. T. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados do solo**. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; MARRIEL, I. E.; GAMAS, E. E. G.; CASELA, C. R.; OLIVEIRA, A. C.; CANTÃO, F. R. Caracterização de genótipos para uso e eficiência de nitrogênio em milho e influência da adubação nitrogenada sobre a incidência e severidade da mancha foliar de *Phaeosphaeria maydis*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS. **Circular Técnica**, 53, 2004.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v. 36, p. 184-189, 2007.

EMPRAVA MILHO E SORGO. **Cultivo do Milho**. 6. ed. 2010. Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/index.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm)>. Acesso em: 20 out. 2011.

EMTIAZI, G.; ETEMADIFAR, Z.; TAVASSOLI, M. Anovel nitrogen-fixing cellulolytic bacterium associated with root of corn is a candidate for production of single cell protein. **Biomass Bioenergy**, v. 25, p. 423-426, 2003.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H.J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**, New York: Chapman and Hall, 1992. p. 1-42.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, I. D. **Produção de Milho**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360p.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S. B.; LISBOA, B. B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L. K.; PASSAGLIA, M. P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44-52, 2012.

FERREIRA, M. C.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; TAKEMURA, S. M.; HUNGRIA, M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of *Bradirhizobium* nodulating soybean. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 627-637, 2000.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **National Academic Sciences**, v. 103, p. 626-631, 2006.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO **Food and Agricultural Commodities Production**, [2013]. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **The road map to the Manual**. 2 ed. New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag, 2001. p. 119-154.
- GHOLAMI, A.; SHAHSAVANI, S.; NEZARAT, S. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 25, 2009.
- GOMES, N. C. M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v. 232, p. 167-180, 2001.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.
- GURTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v. 142, p. 3-16, 1996.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEY, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HANDLEY, B. A.; HEDGES, A. J.; BERINGER, J. E. Importance of host plants for detecting the population diversity of of *Rhizobium leguminosarum* biovar *Viciae* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 241-249, 1998.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 770 p.
- HARTMANN, A.; SCHIMID, M.; VAN TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant Soil**, v. 321, p. 235-257, 2009.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.
- HERNANDEZ-RODRIGUEZ, A.; HEYDRICH-PEREZ, M.; ACEBO-GUERRERO, Y.; VELAZQUEZ-DEL, M. G.; HERNANDEZ-LAUZARDO, N. A. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 180-186, 2008.

HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 878-887, 2010.

HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, v. 141, p. 3229-3239, 1995.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Tibtech**, v. 14, p. 190-197, 1996.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação Biológica do Nitrogênio na Cultura da Soja**. Embrapa Soja, Circular Técnica, 35 e Embrapa Cerrados, Circular Técnica, 13, 2001.

HUNGRIA, M.; CHUEIRI, L. M. O.; COCA, R. G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1349-1361, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 15-17.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Documentos 325).

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, p. 154-160, 2013.

ILYAS, N.; BANO, A.; IQBAL, S.; RAJA, N. I. Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* spp isolated from maize under water stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, p. 71-80, 2012.

JALGAONWALA, R. E.; MAHAJAN, R. T. A Review: Bacterial Endophytes and their Biosprocting. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, p. 795-799, 2011.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 77-119, 1997.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197-209, 2000.

- KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 473-480, 2004.
- KAWAMITSU, Y.; SINGH, R. K.; NELSON, B. J.; TAMAKI, Y.; MURAYAMA, S. Effects of nitrogen supply on growth characteristics and leaf photosynthesis in sugarcane. **Science Bulletin of the Faculty of Agriculture**, v. 46, p. 1-14, 1999.
- KIM, P. I.; CHUNG, K. C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters**, v. 234, p. 177-183, 2004.
- KIRCHMAN, D. L. The ecology of Cytophaga Flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 91-100, 2002.
- KUCEY, R. M. N. Effect of Penicillium bilagion the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 68, p. 261-270, 1988.
- KUNUD, B. S.; GAUR, A. C. Rice response to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and P-solubilizing microorganisms. **Plant Soil**, v. 79, p. 227-234, 1984.
- LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F.; LEMANCEAU, P. The composition of Fluorescent Pseudomonad population associated with roots is influenced by plant and soil type. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2449-2456.
- 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.
- LOIRET, F. G. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 504-11, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LIU, Y.; ZUO, S.; XU, L.; ZOU, Y.; SONG, W. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 1001-1012, 2012.
- LIU, Y.; ZUO, S.; ZOU, Y.; WANG, J.; SONG, W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 71-79, 2013.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. Porto Alegre: Artemed, 2010. 1128 p.

- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHETH, C. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 250-258, 2010.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.
- MARQUES, A. P. G. C.; PIRES, C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 1229-1235, 2010.
- MARIN, V. A.; BALDANI, V. L.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação biológica do nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 1997. 34p.
- MARSCHNER, P.; YANG, C. H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D. E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1437-1445, 2001.
- MARSUDI, N. D. S.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1229-1238, 1999.
- MASSOL-DEYA, A. A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 1995. p. 1-8.
- MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; MONASTEIRO, O. Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. **Science**, v. 280, p. 112-115, 1998.
- MCCULLY, M. E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 983-990, 2001.
- MEDEIROS, M.; BARBOSA, A. S.; MELO, A. S.; LEITE, J. U.; LIRA, W. B.; LACERDA, P. B. **Processo de transição agroecológica: o uso de biofertilizantes líquidos no manejo de pragas agrícolas**. In: III JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 2008, Bananeiras-PB. III JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA. João Pessoa-PB: UFPB, 2008. Disponível em: <[http://www.seminagro.com.br/trabalhos\\_publicados/3jornada/01producao\\_agropecuaria/PA0101.pdf](http://www.seminagro.com.br/trabalhos_publicados/3jornada/01producao_agropecuaria/PA0101.pdf)>. Acesso em: 16 set. 2012.

- MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; MAHAJAN, R.; MAHAJAN, P. K.; SHIRKOT, C. K. Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. **Current Science**, v. 98, p. 538-542, 2010.
- MIKANOVA, O.; NOYAKOVA, J. Evaluation of the P – solubilizing of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. **Rostilinná Výroba**, v. 48, n. 9, p. 397-400, 2002.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Ufla, 2006. 729 p.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.
- MISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Brasil Projeções do Agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**. Brasília: MAPA, 2012. 51 p.
- MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of *pseudomonas* isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.
- NAYAK, B. S.; BADGLEY, B.; HARWOOD, V. J. Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental *Enterococcus* isolated by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 5050-5055, 2011.
- NAUTYAL, C. S.; BHADAURIA, S.; KUMAR, P.; LAL, H.; MONDAL, R.; VERMA, D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 291-296, 2000.
- NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. **Fertilidade do Solo**. Viçosa: UFV, 2007. 1017 p.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p. 1591-1601, 1994.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVARES, F. **Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. Biologia do Solo – Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência dos Solos. Jan./abr. 2009. p. 33-34.
- OPPENHEIM, A. B.; CHET, I. Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. **Trends Biotechnology**, v. 10, p. 392-394, 1992.

PALUS, J. A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P. W.; TRIPLETT, E. W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Ilitis and *Doebley*. **Plant and Soil**, v. 186, p. 135-142, 1996.

PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P.; HEIL, M. The microbe-free plant: fact or artifact? **Frontiers in Plant Science**, DOI: 10.3389/fpls.2011.00100, 2011.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 242, p. 207-220, 1996.

PEIXOTO, A. R.; TORRES, S. B.; KARASAWA, N. Qualidade sanitária de sementes de milho produzidas no submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, p. 12-15, 1998.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PENOT, I.; BERGES, L.; GUIGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profile. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 798-803, 1992.

PEREIRA, B. A.; CASTRO-SILVA, M. A. Rizobactérias formadoras de endósporos associadas a *Tibouchina urvilleana* de áreas impactadas por rejeitos da mineração do carvão. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, p. 563-567, 2010.

PEREIRA, P.; IBÁÑEZ, F.; ROSENBLUETH, M.; ETCHEVERRY, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. **International Scholarly Research Network Ecology**, DOI: 10.5402/2011/938546, 2011.

PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS E. G. M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 439-447, 2006.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; SANTOS, P. E.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic burkholderia species associated field-grown maize sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3103-3110, 2006.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; PENNA, C.; RUIZ, O. A.; CASSÁN, F. D.; LUNA, M. V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1143-1150, 2007.

PINAZZA, L. A.; FAULIN, E. J.; SOLOGUREN, L. J.; GOMES, A. G. **Cadeia Produtiva do Milho**. Brasília: Qualidade, 2007. v. 1.

PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 244, p. 9-17, 2002.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 400-407, 2003.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 254-259, 1997.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 987-994, 2004.

RAI, R.; DASH, P. K.; PRASANNA, B. M.; SINGH, A. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 853-858, 2007.

RANA, A.; SAHARAN, B.; JOSHI, M.; PRASANNA, R.; KUMAR, K.; NAIN, L. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 893-900, 2011.

RATÓN, T. M. O.; YANO, R.; GÁMEZ, O. R.; FLOH, E. I. S.; DÍAZ, M. J. S.; BARBOSA, H. R. Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World Journal Microbiology Biotechnology**, DOI: 101007/s11274-011-0965-2, 2011.

REHMAN, F. U.; ASLAM, M.; TARIQ, M. I.; SHAHEEN, A.; SAMI, A. J.; NAVEED, N. H.; BATOOL, A. I. Isolation of cellulolytic activities from *Tribolium castaneum* (red flour beetle). **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 6710-6715, 2009.

REICHENBACH, H. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy, In: DWORKIN, M.; KAISER, D. **Myxobacteria II**. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1993. p. 13-62.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 435-443, 2011.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 33 p.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação biológica do nitrogênio – estado da arte. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para a agricultura sustentável**. 1. ed. Embrapa informação tecnológica, 2005. p. 151-180.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo. p. 153-174, 2006.

RODRIGUES, W. C. **DivEs - Diversidade de espécies. Versão 2.0. Software e Guia do Usuário**, 2005. Disponível em: <<http://www.ebras.bio.br/dives>>. Acesso em: 05 abr. 2013.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 16, 1986.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 827-837, 2006.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial Endophytes: Recent Developments and Applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 345-352, 2005.

SALLES, J. F.; ANTONIUS Van VEEN, J.; DIRK Van ELSAS, J. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4012-1020, 2004.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SALES, J. F.; ALVARENGA, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; NOGUEIRA, F. D.; SILVA, F. G.; VEIGA, A. D. Efeito da celulase sobre a decomposição do pergaminho e sua influência na velocidade e porcentagem de germinação de sementes de caféiro. **Ciência Agrotecnologia**, v. 29, p. 1146-1152, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. Proc. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

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

SHEEREN, M. B.; KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; DRESSLER, V. L. O processo ANAMMOX como alternativa para tratamento de água residuárias, contendo alta concentração de nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 1289-1297, 2011.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHOMI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 9, p. 535-538, 2008.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of maize diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. 64 p.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; PEREIRA, M. C. B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and enzyme activities. **Biological Control**, v. 29, p. 288-295, 2004.

SILVEIRA, E. L.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS E. G. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1507-1516, 2006.

SIMON, S.; PETRÁSEK, J. Why plants need more than one type of auxin. **Plant Science**, v. 180, p. 454-460, 2011.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 339-353, 2011.

SONG, O. R.; LEE, S. J.; LEE, S. C.; KIM, K. K.; CHOI, Y. L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 151-156, 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **Federation of European Microbiological Societies Review**, v. 31, p. 425-448, 2007.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 2ed., 256p., 1990.

STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. 943 p.

STETS, M. I.; PINTO JUNIOR, A. S.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; GUIMARÃES, V. F.; ALVES, A. C.; STEFFENS, M. B. R.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CRUZ, L. M. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 165, p. 167-174, 2013.

STRALIOTO, R. Aplicação e evolução dos métodos moleculares no estudo da biodiversidade do rizóbio. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa Agrobiologia, 2005. p. 281-322.

- STRIGUL, N. S.; KRAVCHENKO, L. V. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. **Environmental Modelling & Software**, v. 21, p. 1158-1171, 2006.
- SUMMER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**. v. 12, p. 54-123, 1990.
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. **Microrganismos endofíticos de milho (*Zea mays* L.): investigação do potencial promotor de crescimento de bactérias radiculares e diversidade genética de fungos associados a folhas**. 2012. 108f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 722 p.
- TAVARES, R. P. **A Cultura do Milho**. Rio de Janeiro: Tecnoprint, 1988. 129 p.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red polysaccharide interactions of in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from de bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, p. 777-780, 1982.
- TIAN, F.; DING, Y.; ZHU, H.; YAO, L. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 276-284, 2009.
- TROMAS, A.; PERROT-RECHENMANN, C. Recent progress in auxin biology. **Comptes rendus biologiques**, v. 333, p. 297-306, 2010.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water Rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J. D.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Molecular Cellular Biology**, v. 5, p. 25-10, 1994.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.
- VIEIRA JÚNIOR, P. A. Milho (*Zea mays* L.). In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. **Ecofisiologia de Cultivos Anuais: Trigo, Milho, Soja, Arroz, Mandioca**. São Paulo: Nobel, 1999. p. 41-68.
- WANI, S. P.; CHANDRAPALAIH, S.; DART, P. J. Responses of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. **Experimental Agriculture**. v. 21, p. 175-182, 1985.

ZHUANG, X. L.; CHEN, J.; SHIM, H.; BAI, Z. New advances in plantgrowth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environment International**, v. 33, p. 406-413, 2007.

ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Ed. Jaguariuna, 2009.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A

Plantio das Sementes de Milho Germinadas nos Tratamentos Pré-definidos.



**APÊNDICE B**

Germinação de Sementes de Milho Desinfectadas em Papel Filtro e Água Destilada Estéril



### APÊNDICE C

Meios Semi-seletivos LGI e NFb com Formação de Película Característica de Inoculação com Diazotrófico após 7 Dias de Incubação

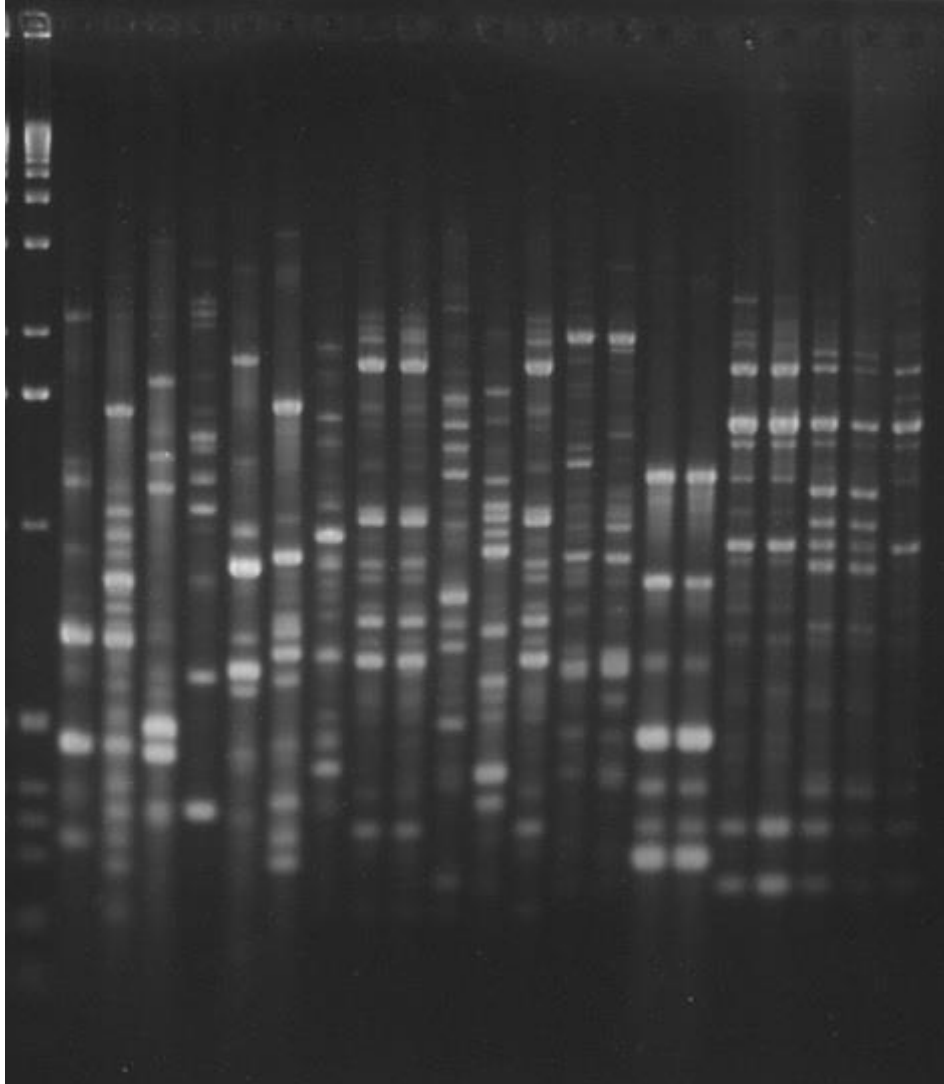


**APÊNDICE D**

Cultura em Meio NFb, JMV e JNFb Sólidos para Verificação da Pureza das Estirpes Isoladas



**APÉNDICE E**  
Gel de BOX-PCR



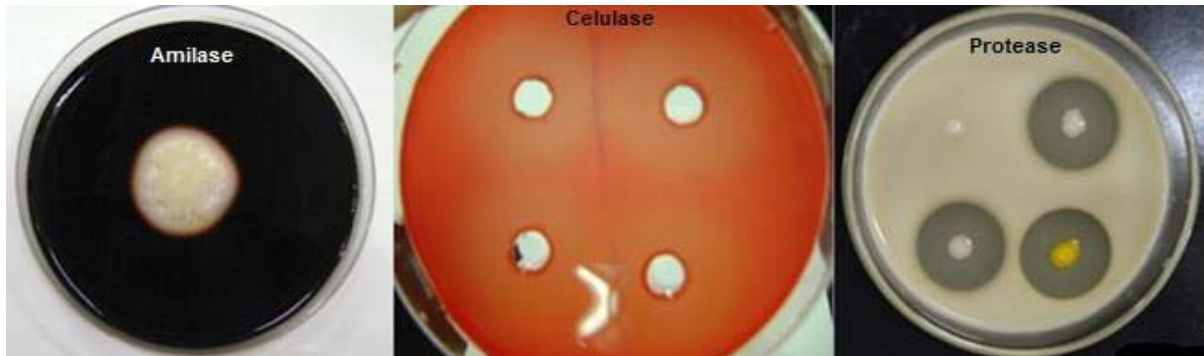
## APÊNDICE F

### Quantificação da Produção de AIA por Turbidimetria



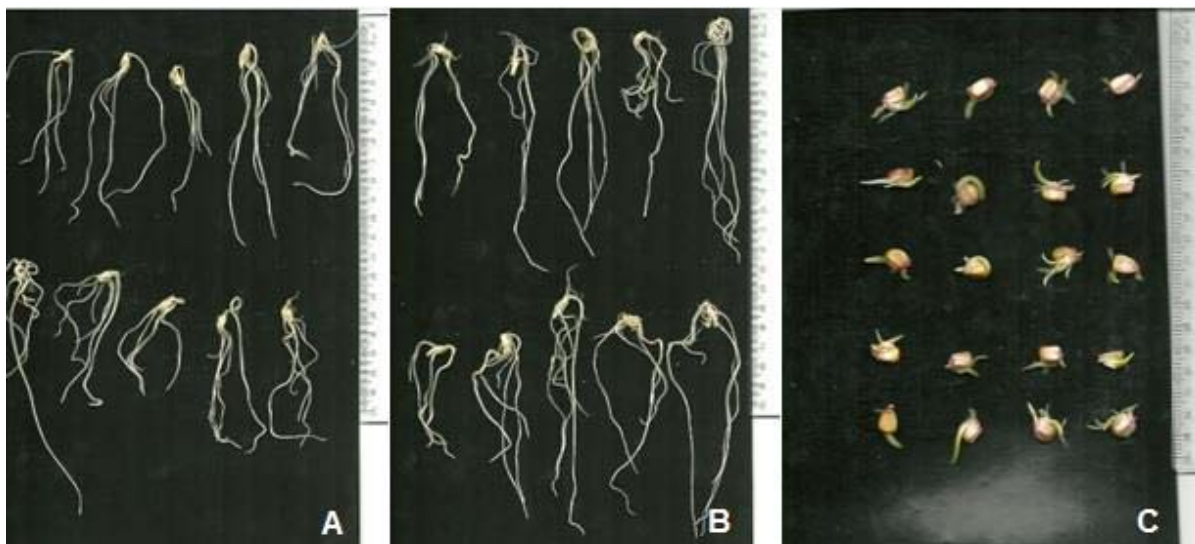
**APÊNDICE G**

Determinação das Enzimas Líticas Amilase, Celulase e Protease pelos Isolados Bacterianos



**APÊNDICE H**

## Germinação de Sementes de Milho Inoculadas



- A: Sementes inoculadas com sobrenadante da cultura de *A. brasilense* (Controle);  
B: Sementes inoculadas com isolado 11AGR1 – *Pseudomonales*;  
C: Sementes inoculadas com isolado 32AGR2 – *Burkholderiales*.

## APÊNDICE I

Caracterização Filogenética e Bioquímica dos Isolados com Ênfase no Potencial Promotor de Crescimento e sua Possível Aplicação Biotecnológica

Isolado	Identidade (Família)	Potencial promotor de crescimento <sup>1</sup>	Principal aplicação biotecnológica <sup>2</sup>
1AGR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Médio	AIA (1); Antagonismo (1)
2AGR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	AIA (3)
3AGR1	<i>Comamonadaceae</i>	Baixo	Protease (3)
4AGR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Médio	Protease (3)
5AGR1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Médio	Protease (2)
6AGR1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Médio	Antagonismo (3)
7AGR1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Baixo	Sol. P (2)
8AGR1	<i>Planctomycetaceae</i>	Médio	Protease (2)
9AGR1	<i>Pseudomonadaceae</i>	Médio	Protease (2)
10AGR1	<i>Pseudomonadaceae</i>	Baixo	Protease (2)
11AGR1	<i>Pseudomonadaceae</i>	Alto	Protease (2); Antagonismo (2)
12AGR1	<i>Pseudomonadaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
13AGR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Médio	Protease (2)
14AGR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Negativo	Protease (2); Sol. P (2)
15AGR1	<i>Pseudomonadaceae</i>	Médio	Protease (2); Antagonismo (2)
16AGR1	<i>Pseudomonadaceae</i>	Médio	Antagonismo (3)
17AGR1	<i>Rhizobiaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
18AGR1	<i>Flavobacteriaceae</i>	Baixo	AIA (1); Protease (1); Antagonismo (1)
19AGR1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Médio	AIA (3)
20AGR2	<i>Burkholderiaceae</i>	Médio	AIA (3)
21AGR2	<i>Pfichickettsiaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
22AGR2	<i>Thermoproteaceae</i>	Baixo	AIA (3)
23AGR2	<i>Rhodocyclaceae</i>	Médio	Protease (2); Sol. P (2)
24AGR2	<i>Enterobacteriaceae</i>	Baixo	AIA (3); Antagonismo (3)
25AGR2	<i>Nelsseriaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
26AGR2	<i>Pseudomonadaceae</i>	Baixo	Protease (2)
27AGR2	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	AIA (3)
28AGR2	<i>Syntrophomonadaceae</i>	Médio	AIA (3); Antagonismo (3)
29AGR2	<i>Cytophagaceae</i>	Baixo	AIA (3); Antagonismo (3)
30AGR2	<i>Nelsseriaceae</i>	Baixo	AIA (3)
31AGR2	<i>Burkholderiaceae</i>	Médio	AIA (3)
32AGR2	<i>Burkholderiaceae</i>	N.D. <sup>3</sup>	Protease (2)
33AGR2	<i>N.I.<sup>4</sup></i>	Negativo	Antagonismo (3)
34AGR2	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)

35AGR2	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	AIA (1); Antagonismo (1)
36GRM1	<i>Aurantimonadaceae</i>	Alto	Protease (2); Antagonismo (2)
37GRM1	<i>Rhodospirillaceae</i>	Médio	Antagonismo (3)
38GRM1	<i>Burkholderiaceae</i>	Médio	Antagonismo (3)
39GRM1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
40GRM1	<i>Rhodospirillaceae</i>	Médio	Antagonismo (3)
41GRM1	<i>Planctomycetaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
42GRM1	<i>Erysipelotrichaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
43GRM1	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
44GRM1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
45GRM1	<i>Pseudomonaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
46GRM1	<i>Rhodocyclaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
47GRM1	<i>Bacillaceae</i>	Médio	Antagonismo (3)
48GRM1	N.I. <sup>4</sup>	Alto	Antagonismo (3)
49GRM1	<i>Rhodospirillaceae</i>	Médio	Protease (2); Antagonismo (2)
50GRM1	<i>Rhodospirillaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
51GRM1	<i>Hydrogenphilaceae</i>	Negativo	Sol. P (2); Antagonismo (2)
52GRM1	<i>Calditerricaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
53GRM1	<i>Anaplasmataceae</i>	Baixo	Protease (2); Sol. P (2); Antagonismo (2)
54GRM1	<i>Carnobacteriaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
55FLR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	Antagonismo (2)
56FLR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Médio	Protease (2)
57FLR1	<i>Xanthomonadaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
58FLR1	<i>Desulfurococcaceae</i>	Médio	Antagonismo (3)
59FLR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
60FLR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	Protease (2)
61FLR1	<i>Burkholderiaceae</i>	Baixo	Protease (2)
62FLR1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)
63FLR1	<i>Enterobacteriaceae</i>	Baixo	Antagonismo (3)

<sup>1</sup>Conforme incremento induzido no comprimento do sistema radicular, conforme Tabela 11; alto potencial – incremento superior a 40% em relação ao controle; potencial mediano – incremento entre 20 e 40% em relação ao controle; baixo potencial – incremento entre 0 e 20% em relação ao controle; potencial negativo – diminuição do comprimento do sistema radicular em 15% ou menor; <sup>2</sup>De acordo com a maior pontuação arbitrária atribuída aos isolados descrita na Tabela 8; <sup>3</sup>N.D. = Não Determinado (não houve emergência de raiz principal); <sup>4</sup>N.I. = Não identificado pelo sequenciamento genético.

**ANEXO**

**ANEXO A**

Meio Dygs (RODRIGUES NETO, 1986)

Glicose	2 g
Ácido Málico	2 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	1000 mL
pH 6,5	

## ANEXO B

Solução Nutritiva de Adubação para Vasos (KAWAMITSU et al., 1999)

	Sol. Estoque (g L <sup>-1</sup> )		Vol. Solução p/ 1 L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80,04		2 mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	110,98		6 mL
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	87,13		12 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09		2 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,50		2 mL
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	12,24		5 mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,546	} S O L } Ú N I C A }	
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,690		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,575		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,125		
H <sub>3</sub> MoO <sub>4</sub>	0,081		

**ANEXO C****Solução Salina para Diluição Seriada (BALDANI, 1980)**

$K_2HPO_4$	sol. 10%	1 mL
$MgSO_4$	sol. 10%	0,5 mL
NaCl	sol. 10%	0,2 mL
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	sol. 10%	0,5 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	1 mL
*Solução de micronutrientes para meio de cultura		0,5 mL
$H_2O$ destilada q.s.p.		1000 mL
pH 6,5		

\* Solução de micronutrientes para meio de cultura (DÖBEREINER et al, 1995)

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,200 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,235 g
$H_3BO_3$	0,280 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,008 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,024 g
$H_2O$ destilada q.s.p.	200 mL

## ANEXO D

### Meios de Cultivo Semi-Seletivos

- **Meio JMV (BALDANI, 1996)**

Manitol		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10%	6 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10%	18 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
*Vitamina para meio de cultura		1 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.		1000 mL
pH 5,0		

\*Vitamina para meio de cultura (DÖBEREINER et al, 1995)

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	200 mL

- **Meio LGI (MAGALHÃES et al., 1983)**

Sacarose		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10%	2 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10%	6 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0,1%	2 mL
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	5 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.		1000 mL
pH 6,0		

- **Meio LGI-P (DÖBEREINER et al, 1995)**

Sacarose		100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10%	2 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10%	6 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0,1%	2 mL
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	5 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.		1000 mL
pH 5,5		

- **Meio JNFb (BALDANI, 1996)**

Ácido Málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10%	6 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10%	18 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
KOH		4,5 g
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		20 mg
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.		1000 mL
pH 5,8		

- **Meio NFb (BALDANI & DÖBEREINER, 1980)**

Ácido Málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10%	5 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 10%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
KOH		4,5 g
Solução de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		50 mg
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.		1000 mL
pH 6,5		