



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KELLY CAMPOS GUERRA PINHEIRO DE GOES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS AO GIRASSOL
(*HELIANTHUS ANNUUS*)**

Londrina
2011

KELLY CAMPOS GUERRA PINHEIRO DE GOES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
ISOLADOS DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO
CRESCIMENTO VEGETAL ASSOCIADAS AO GIRASSOL
(*HELIANTHUS ANNUUS*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:
Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)

G598c Goes, Kelly Campos Guerra Pinheiro de.
Caracterização bioquímica e molecular de isolados de bactérias
promotoras do crescimento vegetal associadas ao girassol
(*Helianthus annuus*) / Kelly Campos Guerra Pinheiro de Goes. –
Londrina, 2011.
134 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, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia vegetal – Teses. 2. Girassol – Teses. 3. Plantas
oleaginosas – Teses. 4. Nitrogênio – Fixação – Teses. 5.
Biotecnologia agrícola – 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

KELLY CAMPOS GUERRA PINHEIRO DE GOES

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL
ASSOCIADAS AO GIRASSOL (*HELIANTHUS ANNUUS*)**

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Claudio Guilherme Portela de Carvalho
EMBRAPA-SOJA – Londrina - PR

Dr^a. Diva Souza Andrade
IAPAR - PR

Londrina, 25 de março 2011.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Everaldo e Helzira.
Meus irmãos Haline e Everaldo Júnior,
e sobrinhos Marcos Henrique e Thiago Hideo,
razões da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sua infinita graça e misericórdia que tem me sustentado todos os dias da minha vida.

Ao professor André Luiz Martinez de Oliveira pela orientação, dedicação, confiança, disponibilidade de tempo, paciência e ensinamentos durante a execução desse projeto.

Aos professores e ao programa de Mestrado em Biotecnologia e a Universidade Estadual de Londrina.

Aos meus pais e familiares que me sustentaram em orações durante esse período.

Ao Luiz Rafael pelo amor, companheirismo e carinho em todas as horas.

Aos colegas do Mestrado pela amizade e companheirismo durante esses dois anos de curso, Aline, Adriana, Ana Elisa, Carolina, Douglas, Fernando e Luciana.

Aos colegas do Laboratório pela amizade e colaboração, Otto, Maria Luísa, Artur, Paulo, Emilyn, Mariane, Eddie e Humberto. Aos técnicos Silvia Borba e Nelson pelo auxílio.

As melhores amigas do mundo Patrícia Bahls e Jailda dos Santos, obrigada por me ouvirem sempre.

A Dr^a. Diva de Souza Andrade por todo o incentivo, apoio e amizade sempre. E ao Dr. Claudio Guilherme Portela de Carvalho por aceitar tão prontamente ser membro da banca e pelas contribuições para o trabalho.

Às instituições que contribuíram para execução desse projeto, UEL, CNPq, INCT-Curitiba, Capes e Fundação Araucária.

Ora, se algum de vós tem falta de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá liberalmente, e não censura, a ser-lhe-á dada. Peça-a, porém com fé, não duvidando [...].

Tiago 1:5-6

GOES, K. C. G. P. **Caracterização bioquímica e molecular de isolados de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas ao girassol (*Helianthus annuus*)**. 2011. 134f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2011.

RESUMO

Estudos de associações entre microrganismos promotores do crescimento em plantas apresentam um enorme potencial devido aos benefícios dados sobre a produtividade. A cultura do girassol possui aspectos interessantes para o agronegócio, com a crescente demanda por óleos vegetais para a indústria alimentícia e como matéria-prima na produção de combustíveis renováveis. A importância econômica do girassol, bem como a necessidade de cultivá-lo em diversos ambientes, torna interessante o estudo da sua interação com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) que auxiliam sua sobrevivência em diferentes condições de solo. O objetivo desse trabalho foi identificar e avaliar a diversidade genética de parte da comunidade bacteriana associada à cultura do girassol, buscando identificar isolados capazes de atuar na promoção de crescimento vegetal. Os 57 isolados foram obtidos de amostras da rizosfera, raiz, capítulo e colmo das plantas de girassol das cultivares Helio 251 e Aguará 3, avaliados quanto à capacidade de produção de auxina, produção de proteínas, atividade antagonista, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e quitinase. Foi utilizada a técnica de seqüenciamento para identificação taxonômica e a diversidade intragênica observada com base em marcadores RAPD das espécies de bactérias associadas às plantas de girassol. Através das técnicas utilizadas foi possível identificar que todos os isolados de bactérias apresentaram características de microrganismos promotores do crescimento vegetal. Três isolados do colmo, capítulo e rizosfera do girassol apresentaram habilidade de FBN em meio de cultura sem nitrogênio, e sete isolados do colmo, capítulo e raiz apresentaram atividade antagonista contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Todos os isolados apresentaram habilidade de produzir auxinas “in vitro” e nenhum dos isolados apresentou produção da enzima quitinase. Do total de 57 isolados, 32 apresentaram produção de sideróforos. Foi possível observar através dos marcadores de RAPD o agrupamento dos isolados obtidos das mesmas partes das plantas com alta similaridade. O seqüenciamento do gene 16S RNAr de 45 isolados permitiu classificar 42 como pertencente ao gênero *Bacillus*, compreendendo as espécies *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e *Bacillus* sp. Somente 3 isolados obtidos foram classificados fora do gênero *Bacillus*, sendo identificadas como *Methylobacterium* sp.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas. *Bacillus*. RAPD. Gene 16S RNAr.

GOES, K. C. G. P. **Molecular and biochemical characterization of plant growth promoting bacteria isolated and associated with sunflower** (*Helianthus Annuus*). 2011. 134f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2011.

ABSTRACT

Studies of associations between microbial growth promoters in plants have enormous potential benefits due to productivity data. The sunflower crop has interesting aspects for agribusiness, with the growing demand for vegetable oils for food and as raw material in the production of renewable fuels. The economic importance of the sunflower, as well as the need to cultivate it in several environments, it is interesting to study its interaction with the Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) that assists their survival in different soil conditions. The aim of this study was to identify and evaluate the genetic diversity of the bacterial community-associated with sunflower crop in order to identify isolates capable of functioning in plant growth promotion. The 57 isolates were obtained from samples from the rhizosphere soil, roots, stem and florets of sunflower plants of the cultivar Helio 251 and Aguará-3, evaluated for their ability to produce auxin, protein production, antagonistic activity, phosphate solubilization, production of siderophore and chitinase. Sequencing technique was used for identification and the intragenic diversity based on RAPD were observed of species of bacteria associated with sunflower plants. Through the techniques used could be identified that all strains of bacteria were characteristic of microbial plant growth promoters. Three strains of stems, florets and rhizosphere showed ability to biologically fix atmospheric nitrogen, and seven isolates from the stems, florets and roots showed antagonistic activity against the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. All isolates had the ability to produce auxins in vitro and none of the isolates showed production of the enzyme chitinase. Of the total 57 isolates, 32 showed siderophore production. The RAPD analysis showed a broad diversity among the isolates, which clustered together regarding the plant tissue of origin. The 16S rRNA gene sequences allowed the identification of 45 PGPB; 42 *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* and *Bacillus* sp.) and three isolates were classified outside of the genus *Bacillus*, identified as *Methylobacterium* sp.

Keywords: Endophytic bacteria. *Bacillus*. RAPD. 16S rRNA gene

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - DNA extraído dos isolados submetido à eletroforese (85 V por 45 minutos) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Linhas 1 a 5 padrões de DNA λ (ng/ μ L) 85, 170, 300, 255 e 425, linhas 6 a 19 isolados CA, CB, CC, CD, CR,CF, CH, CJ, CK, CK', CK'', CL, CM e TSAB43
- Figura 2** - Produto da amplificação por RAPD com iniciadores P2 e P3 submetido à eletroforese (85 V por 120 minutos) em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Linhas 1 a 11, isolados ZG, ZF', ZF, ZE, ZD, ZC, ZB'', ZB', ZB, ZA, ZK, linha 12 marcador molecular KB, linha 13 controle negativo, linhas 14 a 22 CB, CCB, CCR, CK, T2AJII, T2AF e T2AJI.....44
- Figura 3** - Dendrograma genético dos isolados de girassol, após a análise dos perfis eletroforéticos obtidos pela técnica de RAPD. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e coeficiente de Jaccard46
- Figura 4** - Produto da amplificação por PCR do gene 16S rRNA, com iniciadores 27F e 778R submetido a eletroforese (90 V por 70 minutos) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Linha 1 Marcador Molecular KB, Linha 2 a 12 isolados CA, CB, CC, CD, CE, CF, CH, CJ, CK, CK', CK''47
- Figura 5** - Isolados de girassol, T1AG, CH, CF, ZR-G, crescidas em meio NFb durante a terceira avaliação para observar película de crescimento.....52
- Figura 6** - Atividade antagonista do isolado CC-R (A) e do isolado RI-G (B) contra o fungo *S. sclerotiorum* em meio Dygs55
- Figura 7** - **(A)** Fungo *S. sclerotiorum* em meio Dygs. **(B)** Atividade antagonista do isolado RI-G contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* em meio Dygs.....55

Figura 8 - Produção de sideróforos em meio Dygs suplementado com CromoAzuroI S. **(A)** Isolados do capítulo T4AE e T2AJ-II. **(B)** Isolados da raiz RI-A e do capítulo T4AL-

I.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores arbitrários utilizados para análise de RAPD, seqüência de nucleotídeo e referências bibliográficas.....	34
Tabela 2 - Origem de isolamento e codificação dos isolados obtidos da cultivar de girassol Helio 251	42
Tabela 3 - Origem de isolamento e codificação dos isolados obtidos da cultivar de girassol Aguará 3.....	43
Tabela 4 - Identificação de isolados do ambiente rizosférico e endofítico (raízes, colmos e capítulo) de bactérias promotoras de crescimento associadas ao girassol. Identidade por homologia à seqüência parcial do gene 16S rRNA.....	49
Tabela 5 - Atividade antagonista dos isolados de girassol contra o fungo fitopatogênico <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . Atribuição de notas segundo a atividade antagonista.....	54
Tabela 6 - Potencial de solubilização de fosfato por isolados bacterianos associados a diferentes tecidos de duas variedades de girassol.....	59
Tabela 7 - Produção de auxinas e proteínas dos isolados de girassol.....	61
Tabela 8 - Potencial de produção de sideróforos por isolados bacterianos associados a diferentes tecidos de duas variedades de girassol.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido indol-3-acético
ANP	Agência Nacional de Petróleo
BPCV	Bactérias promotoras do crescimento vegetal
C	Carbono
CaHPO ₄	Fosfato de cálcio bibásico anidro
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
ELC	Extrato livre de células
FBN	Fixação biológica do nitrogênio
Fe	Ferro
FeCl ₃ .6H ₂ O	Cloreto férrico pentahidratado
FeEDTA	Ferro EDTA
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de ferro heptahidratado
g	Gramma
g/L	Gramma por litro
ha	Hectare
HCl	Ácido clorídrico
HClO ₄	Ácido perclórico
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilograma
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litro
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Nitrogênio
N ₂ O	Óxido nitroso
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NFb	Novo Fábio Pedrosa
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
nm	Nanômetros
NO ₃	Nitrato
P	Fósforo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Cloreto de polivinila
RAPD	Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBE	Tris-EDTA ácido bórico
UA	Unidade de atividade
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A CULTURA DO GIRASSOL E BIODIESEL	17
2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL.....	22
2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS.....	26
3 OBJETIVO	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E MEIO DE CULTIVO UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	31
4.2 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	32
4.2.1 Extração do DNA genômico total	32
4.2.2 Análise da variabilidade genética por Marcadores de RAPD-PCR	33
4.2.3 Amplificação da subunidade ribossomal 16S rRNA por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia).....	34
4.2.4 Reação de sequenciamento.....	35
4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS	35
4.3.1 Avaliação da capacidade de fixação biológica do nitrogênio.....	35
4.3.2 Avaliação da atividade antagonista dos isolados contra o fungo fitopatogênico <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	36
4.3.4 Produção de quitinase e determinação da atividade quitinásica	37
4.3.5 Solubilização de fosfatos.....	38

4.3.6 Produção e determinação de auxinas	38
4.3.7 Determinação de proteínas	39
4.3.8 Produção de sideróforos	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Origem e identificação dos isolados obtidos do girassol	41
5.2 Extração de DNA genômico total	43
5.3 Análise da variabilidade genética por marcadores de RAPD-PCR	44
5.4 Amplificação da subunidade ribossomal 16S rDNA por PCR.....	47
5.5 Reação de sequenciamento.....	48
5.6 Fixação Biológica do Nitrogênio	51
5.7 Avaliação da atividade antagonista dos isolados contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , fitopatógeno do girassol.....	53
5.8 Produção de quitinase e determinação da atividade quitinásica.....	57
5.9 Solubilização de fosfatos.....	58
5.10 Produção de auxinas e determinação de proteínas	61
5.11 Produção de Sideróforos.....	64
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS	83
ANEXO A – Meio de cultura Dygs (RODRIGUES NETO, et al., 1986)	84
ANEXO B – Meio Novo Fábio (DÖBEREINER et al., 1995).....	85
ANEXO C – Meio para produção de quitinase (MONREAL ; REESE, 1969)	86
ANEXO D – Meio para Solubilização de Fosfato (NAUTIYAL, 2002).....	87
ANEXO E – Manuscript: Biochemical and molecular characterization of high population densitiy bacteria isolated from sunflower	88

1 INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus L.*) é uma das culturas oleaginosas mais importantes nas regiões temperadas, devido ao seu ciclo reduzido, elevado teor de óleo, fotosensibilidade e adaptabilidade às diferentes solos e condições ambientais (LAKSHMINARAYANA, 1993).

O girassol é uma espécie vegetal nativa da América do Norte, cultivada em todos continentes, suas sementes possuem 35 a 50 % de óleo de alta qualidade. O girassol é utilizado para produção de óleo comestível e devido ao teor de proteínas, constitui uma opção para alimentação animal, na forma de torta ou farelo ele é usado também na floricultura e como matéria prima para produção de biocombustíveis (SILVA et al., 2007; IAPAR – documento da web).

O rendimento de sementes de girassol é influenciado pelo genótipo do vegetal, pelos nutrientes disponíveis, principalmente N e P, à escolha da época de semeadura, considerando o sistema de rotação e sucessão de culturas, além dos fatores ambientais, como a distribuição de água uniforme durante o ciclo da cultura (LAKSHMINARAYANA, 1993, CAMPOS-LEITE et al., 2007).

A produção brasileira de girassol aumentou de 74.504 toneladas, no ano agrícola 2001/2002, para 93.600 toneladas em 2009/2010 (CONAB, Julho/2010 – documento da web). A produtividade, no entanto, ainda não ultrapassou a média de 1.400 toneladas por hectare. A área cultivada com girassol, no Brasil, saltou de pouco mais de 55 mil hectares em 2001 para mais de 99 mil hectares em 2007. A produção mundial de girassol em 2004 foi de, aproximadamente, 26.066 mil toneladas sendo os maiores produtores a Rússia, com 16,5 % da produção mundial, a Argentina, com 15,35 % e a União Européia, com 14,81 % (AGRIANUAL, 2005).

A multiplicidade do uso da cultura do girassol torna necessários estudos para o desenvolvimento de formas de manejo que proporcionem um melhor aproveitamento da cultura, diminuam os insumos, impactos ambientais e aumentem a produtividade.

O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são os principais nutrientes limitantes ao crescimento vegetal, e a maioria dos solos tropicais contém baixas quantidades

destes elementos. Sendo o N o nutriente que mais limita a produção do girassol (CAMPOS-LEITE, 2007).

Os principais adubos nitrogenados produzidos no mundo são sintetizados a partir do N_2 atmosférico e do H em amônia anidra, obtida de combustíveis fósseis não renováveis, principalmente o gás natural e petróleo (DIAS ; FERNANDES, 2006). Por meio desse processo, cerca de, 1,2 a 1,8 % do consumo global de energia fóssil é utilizada para a produção de fertilizantes nitrogenados (LAGREID et al., 1999). Uma alternativa a sua aplicação e produção são os inoculantes microbianos contendo bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico.

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é mediada por uma parcela dos procariotos, que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. A maioria das espécies que fixam o N é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de diversas plantas (MOREIRA ; SIQUEIRA, 2006).

A FBN desempenha papel importante no aporte de N aos ecossistemas agrícolas. Estima-se que no mundo a FBN em áreas cultivadas contribua com 32 Mg ano^{-1} de N, o que corresponde a 30 % do N produzido na forma de fertilizantes (COSTA et al., 2009).

O conhecimento da ecologia da rizosfera e suas implicações sobre fisiologia vegetal têm mudado as práticas de manejo tradicional das culturas, especialmente em relação à nutrição vegetal e mecanismos defensivos.

O isolamento e seleção de microrganismos, que incluem bactérias que promovem o crescimento vegetal, são passos importantes para a utilização destes microrganismos na produção de inoculantes para o uso na agricultura. Estes microrganismos aumentam a disponibilidade de nutrientes, como fósforo e ferro; produzem fitormônios, como ácido-indol-3 acético (AIA) e citocininas (HYNES et al. 2008) e fixam o N atmosférico.

Hoje, é aceito o fato de que certas estirpes de bactérias da rizosfera, designadas por bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), estimulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. A promoção do crescimento, na

maioria das vezes, implica no fornecimento de compostos sintetizados pelas bactérias para a planta, no aumento da eficiência de absorção de certos nutrientes, ou pelo aumento da resistência vegetal a estresses bióticos e/ou abióticos.

Bactérias de diversas classes taxonômicas foram encontradas na rizosfera de diversas culturas e solos, e muitas delas podem aumentar o crescimento e produtividade. Bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, e *Azospirillum* têm sido relatadas por promover o crescimento e a indução de resistência sistêmica em plantas (KLOEPPER et al. 2004).

Muitas culturas agrícolas demonstram potencial para obter benefícios pelo uso de inoculantes contendo BPCV, entre elas as mais estudadas são gramíneas, como o milho, trigo, arroz e a cana de açúcar (KHALID et al., 2004, ASHRAFUZZAMAN et al., 2009).

Segundo Forchetti et al. (2007), BPCVs associadas com culturas produtoras de óleo (oleaginosas) não foram bem estudadas. Hanada e Romeiro (1998) relataram promoção de crescimento por uma de um total de 88 rizobactérias presentes na rizosfera de girassol.

Entre as bactérias presentes nas raízes de girassol, Forchetti e colaboradores (2007) isolaram 29 bactérias endofíticas, entre elas isolaram 8 com habilidade de FBN. Uma estirpe apresentou sequência homóloga a *Achromobacter* sp. 99,9 % idêntica à *Xiloxidans* ou *A. alcaligenes* sp., e 7 apresentaram 99 % de homologia com *Bacillus* sp., idêntica à *B. pumilus*.

Devido à importância da cultura do girassol, e a necessidade de cultivá-lo em áreas ambientalmente desfavoráveis é interessante o estudo da diversidade e a interação de microrganismos associados ao girassol que auxiliam sua sobrevivência sob condições de estresse. A determinação das espécies dessas bactérias auxiliará na possível aplicação como inoculantes para cultura do girassol e, conseqüente, diminuição no uso de insumos e nos custos de produção, mantendo ou aumentando a produtividade observada para a cultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO GIRASSOL E BIODIESEL

O termo girassol (*Helianthus annuus* L.) explica não só o nome comum como o nome botânico da planta, tendo em vista que o gênero deriva do grego *helios*, que significa sol, e de *anthus*, que significa flor. É uma dicotiledônea anual, pertencente à ordem Asterales e família Asteraceae, a maior família das Angiospermas. É uma planta de fecundação cruzada, sendo feita basicamente por insetos, particularmente as abelhas (CASTRO; FARIAS, 2005).

O girassol tem como centro de origem o México. Evidências arqueológicas revelaram o uso do girassol entre os índios norte-americanos por volta de 3.000 a.c. É uma planta cultivada nos cinco continentes, com grande importância na economia mundial. Juntamente com a soja e a canola é uma das três mais importantes culturas anuais produtoras de óleo comestível do mundo, despertando, atualmente, grande interesse no mercado dos biocombustíveis, em função do elevado teor de óleo nos aquênios (35 a 50 %) e de sua ampla adaptação às diferentes regiões edafoclimáticas (KUMAR et al., 2000; CASTRO; FARIAS, 2005; BERGLUND, 2007).

No Brasil, o girassol apresenta desenvolvimento adequado desde o Estado do Rio Grande do Sul até o Cerrado do Estado de Roraima. Pode ser cultivado como primeira cultura, aproveitando o início das chuvas (inverno-primavera), beneficiando-se da característica de tolerância a baixas temperaturas no início do ciclo ou, como segunda cultura (verão-outono), pelos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico (CASTRO; OLIVEIRA, 2005).

O cultivo do girassol apresenta elevado interesse comercial, apesar da pouca exploração no cenário agrícola brasileiro. A produtividade tem oscilado muito ao longo dos anos, e a razão da baixa produtividade é o baixo uso de tecnologias de produção (DALL'AGNOL et al., 2005). De acordo com o levantamento sistemático da produção agrícola do IBGE, em 2009 a quantidade colhida no Brasil

de sementes de girassol foi de 97.445 toneladas. A produção esperada para 2010 será de 99.766 toneladas (IBGE, 2010).

Apesar de ser uma cultura de verão, o girassol vem se consolidando como uma alternativa viável para os cultivos em sucessão às principais culturas, principalmente milho e soja. De maneira geral, as condições de fertilidade do solo adequadas ao girassol não diferem das exigidas pelas culturas como a soja ou o milho. No entanto, há uma maior necessidade de avaliação e controle da compactação do solo e da acidez superficial, que podem limitar o desenvolvimento radicular intensificando assim os problemas nutricionais e reduzindo o potencial produtivo da cultura (CASTRO; OLIVEIRA, 2005).

Para que o girassol expresse seu potencial produtivo, o suprimento de água e nutrientes deve ser adequado no início do seu desenvolvimento, principalmente, a partir da emissão do botão floral quando se inicia o período de maior crescimento da planta (CASTRO; OLIVEIRA, 2005).

Um dos nutrientes mais requeridos pela cultura do girassol é o N, acumulando $130 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ na biomassa do vegetal, sendo também o nutriente que limita a produção do girassol. Sua deficiência pode ocasionar uma redução de até 60 % na produtividade, já que o rendimento das sementes é favoravelmente influenciado pelo genótipo das plantas e pelo fornecimento dos nutrientes, principalmente o N e P (KUMAR, et al., 2000; CAMPOS-LEITE et al., 2007).

Nas oleaginosas, o N influencia o metabolismo da síntese de compostos de reserva nas sementes, determinando o equilíbrio nos teores de óleo e proteínas acumulados. Recomenda-se a adubação do girassol utilizando doses entre 40 e $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de N, aplicando-se $1/3$ na semeadura e $2/3$ até 30 dias após a emergência das plantas (CASTRO; OLIVEIRA, 2005; IAPAR, 2005).

Depois do N, o fósforo é o nutriente mais limitante ao crescimento vegetal e as formas predominantes absorvidas pelas plantas são H_2PO_4 e HPO_4^{-2} . Como o P solúvel aplicado no solo via fertilizantes químicos é rapidamente imobilizado pela reação com o ferro, alumínio ou cálcio, grande parte se torna indisponível para as plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Os microrganismos, bactérias e fungos, têm papel essencial no ciclo do P na natureza, atuando na solubilização de fosfato inorgânico ou mineralização do fosfato orgânico de uma variedade de substratos. A disponibilidade de P é uma etapa limitante para a nutrição da planta, e a habilidade de solubilizar fosfato inorgânico por bactérias associativas representa um grande potencial para promoção do crescimento vegetal (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

O uso difundido de fertilizantes nitrogenados aumentou o rendimento das colheitas, mas também causaram efeitos deletérios sobre os ecossistemas, como exemplo, a poluição do solo e águas superficiais pelo nitrato (NO_3), a acidificação do solo e produção de óxido nitroso (N_2O) através da desnitrificação (BISWAS et al., 2000). A associação das plantas com bactérias fixadoras de N atmosférico têm sido considerado como uma possível alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados inorgânicos, assim como a associação com bactérias capazes de solubilizar/mineralizar P inorgânicos ou orgânicos pode auxiliar a promoção de crescimento e aumento do rendimento das plantas (AHMAD et al., 2006).

A alta demanda de energia no mundo industrializado, tanto no setor doméstico, como nos transportes e na indústria, tem aumentado conseqüentemente, os problemas derivados do uso generalizado de combustíveis fósseis tornando cada vez mais necessário o desenvolvimento de fontes de energia renováveis, de menor impacto ambiental que os tradicionais e de baixo custo (ANTOLÍN et al., 2002).

O biodiesel, combustível composto de mono-alkilésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais, pode ser obtido de fontes renováveis como óleos vegetais através de processo de transesterificação, no qual ocorre a conversão de triglicerídeos em ésteres de ácidos graxos (ENCINAR et al., 2002), que apresentam viscosidade, ponto de fulgor e de solidificação mais baixos que o óleo diesel. Esta modificação da estrutura dos óleos é uma alternativa para substituição do óleo diesel derivado do petróleo por um combustível oriundo de biomassas renováveis (REGINATO D'ARCE; FERRARI, 2005).

O biodiesel obtido a partir de culturas agrícolas ou a partir de óleos vegetais produz efeitos favoráveis sobre o meio ambiente, tais como uma diminuição de chuva ácida e do efeito estufa por promover o sequestro de carbono através do envolvimento dos processos fotossintéticos. Devido a esses fatores e à sua biodegradabilidade, a produção de biodiesel é considerada uma vantagem em relação aos combustíveis fósseis. Além disso, o biodiesel demonstra a redução da emissão de gás carbônico (CO₂), enxofre e hidrocarbonetos não queimados durante o processo de combustão, comparados ao diesel de petróleo (ANTOLÍN et al., 2002).

Parte do biodiesel produzido no mundo deriva do óleo de soja e canola (CANAKCI; VAN GERPEN, 2001). Em vista das inúmeras possibilidades de obtenção de matéria-prima (soja, mamona, girassol, palma, etc.) para a produção de biodiesel, o Brasil destaca-se no panorama mundial como potencial fornecedor. A autorização do uso de misturas com 2 % de biodiesel no óleo diesel pelo governo federal brasileiro é o passo inicial para reduzir o uso de óleo diesel e aumentar ações de pesquisa sobre óleos vegetais (CORRÊA, et al. 2008).

Dentre os complexos com grandes potenciais de crescimento está inserido aquele relacionado com a exploração do girassol (FERRARI; SOUZA, 2009). Os desafios que o girassol enfrenta no Brasil são: oferecer aos produtores uma cultura alternativa que, em caráter complementar, possibilite uma segunda colheita, sobre a mesma área e mesmo ano agrícola; oferecer mais uma matéria-prima oleaginosa às indústrias de processamento de outros grãos, e oferecer ao mercado um óleo comestível de alto valor nutritivo (PELEGRINI, 2003) e ser uma alternativa para produção de energia, já que o óleo de girassol pode ser utilizado como matéria-prima para produção de biodiesel (LEITE et al., 2005).

Antolín e colaboradores (2002) estudaram a transesterificação para transformação do óleo de girassol para a obtenção de biodiesel. Eles otimizaram a produção pelas variáveis: condições de temperatura, proporção dos reativos e métodos de purificação, com a proposta de obter um biodiesel de alta qualidade. Os ésteres metílicos do girassol foram caracterizados para testar suas propriedades como combustível em motores diesel. Os resultados mostraram que o biodiesel

obtido do girassol nas condições otimizadas foi um ótimo substituto aos combustíveis fósseis.

Souza e colaboradores (2005) produziram biodiesel de óleo bruto de girassol através da rota etílica, e efetuaram a caracterização físico-química segundo metodologias estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP). O biocombustível mostrou-se totalmente convertido em ésteres etílicos de ácidos graxos, através de análise qualitativa por cromatografia em camada delgada e apresentou-se dentro das especificações para todos os parâmetros analisados, exceto para o teor de resíduo de carbono e ainda apresentou baixo teor de enxofre.

O girassol é uma das mais importantes plantas oleaginosas no mundo, e tem uma crescente importância econômica e agrônômica no Brasil onde o seu potencial de aumento na produtividade é grande (FAGES; ARSAC, 1991; CASTRO; OLIVEIRA, 2005). A rizosfera de diversas culturas foi descrita, mas poucos trabalhos têm sido realizados com rizobactérias presentes na cultura do girassol, sendo necessários estudos para identificar os microrganismos associados ao girassol e seu possível potencial de promoção de crescimento vegetal.

2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

A teoria de que bactérias não patogênicas residem tecidos de plantas foi formulada por Perotti, em 1926, em um trabalho pioneiro sobre interações plantas-microrganismos, ao observar a presença de bactérias em tecidos corticais de raízes saudáveis (HALLMANN et al., 1997). Porém, estudos sobre a colonização de tecidos internos de plantas saudáveis por bactérias datam de 1870, com os trabalhos de Pasteur e outros pesquisadores (HOLLIS, 1951).

Pesquisas demonstraram que bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e reduzir os sintomas de doenças causadas por diversos patógenos (HALLMANN et al., 1997; CANBOLAT et al., 2006; OLIVARES, 2009). Os efeitos na promoção de crescimento incluem aumentos na altura, na biomassa da parte aérea, do caule, da raiz e na formação de pêlos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e melhora na mobilização de nutrientes no solo (PILLAY; NOWAK, 1997; GRAY; SMITH, 2005).

Espécies de bactérias do solo que se desenvolvem na rizosfera, mas que podem crescer sobre ou em torno dos tecidos da planta, estimulam o crescimento vegetal por múltiplos mecanismos (VESSEY, 2003). Os principais mecanismos pelos quais as bactérias promovem o crescimento de plantas são a fixação de nitrogênio (BODDEY; DOBEREINER, 1995; GRAY; SMITH, 2005), produção de hormônios vegetais, solubilização de minerais, como fósforo, produção de sideróforos, competição por nutrientes, controle biológico de fitopatógenos e pragas e indução de resistência sistêmica (GLICK, 1995; HALLMANN et al., 1997; LUCY et al., 2004; AHMAD et al., 2006; SOLANO et al., 2008).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (*plant growth promoting rhizobacteria* ou PGPR) constituem um grupo diversificado de bactérias colonizadoras da rizosfera e microrganismos diazotróficos que, quando cultivadas em associação com plantas estimulam seu crescimento (PIAO et al., 1992; VESSEY, 2003; BANCHIO, 2008).

As rizobactérias podem apresentar-se em diferentes locais próximos ou mesmo na raiz da planta: (I) bactérias vivendo no solo perto das raízes, utilizando

metabólitos excretados pela raiz como fontes de C (carbono) e N, (II) bactérias colonizando o rizoplane (superfície radicular), (III) bactérias residindo no tecido radicular, habitando os espaços entre células corticais e (IV) bactérias vivendo dentro das células em estruturas radiculares especializadas (VESSEY, 2003; SILVEIRA, 2008).

Os grupos mais estudados de BPCVs pertencem aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, que, além de promoverem crescimento, atuam como agentes no controle biológico de várias pragas e doenças (MISKO; GERMIDA, 2002, AHMAD et al., 2006).

Uma variedade de bactérias pode ser considerada BPCV, incluindo espécies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, assim como as bactérias diazotróficas endofíticas, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp.* e *Burkholderia* que constituem um grupo importante conhecido pelos efeitos benéficos ao crescimento das plantas (TANG, 1994; AHMAD, 2006).

As maneiras pelas quais as BPCVs podem influenciar o crescimento vegetal diferem de espécie para espécie, bem como de linhagem para linhagem. As rizobactérias de vida livre geralmente não têm um único mecanismo de promoção do crescimento das plantas (GLICK et al., 1999). Em adição à fixação de nitrogênio, várias BPCV extracelulares são capazes de fornecer ferro (Fe) à planta em solos com limitação desse composto, ou outros minerais importantes, como, por exemplo, fosfatos (SINGH; KAPOOR, 1998).

A produção de fitormônios como, auxina, citocinina e giberelina são os mecanismos mais comuns de promoção de crescimento vegetal; com a auxina sendo de interesse primário (GARCIA de SALAMONE et al., 2001). As auxinas estão bem caracterizadas na classe de hormônios vegetais, especialmente o ácido indol-3-acético (AIA), conhecido por estimular as respostas de crescimento em plantas tanto a curto como em longo prazo. Os primeiros relatos de produção de AIA por BPCV remontam à década de 1970. Tien et al. (1979) demonstraram que o *Azospirillum brasilense* produzia AIA, bem como o ácido láctico quando exposta ao aminoácido triptofano.

As aplicações e investigações das associações de plantas com BPCVs têm sido relatadas em milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), aveia (*Avena sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*), ervilha (*Pisum sativum*), canola (*Brassica napus*), soja (*Glycine max*), batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), lentilha (*Lens culinaris*), alface (*Lactuca serriola*), rabanete (*Raphanus sativus*) e pepino (*Cucumis sativa*) (GRAY; SMITH, 2005).

As bactérias que apresentarem mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal como, por exemplo, fixar nitrogênio e solubilizar fosfato 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).

Faltam informações a respeito de microrganismos fixadores de N de vida livre. Os estudos de ecologia microbiana que buscam aumentar o conhecimento a respeito dos processos interativos no ambiente podem auxiliar no entendimento destes, visto que já foi observado que bactérias podem conferir as plantas uma maior resistência a condições de estresse, proteção contra organismos patogênicos, além da produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal.

Mesmo sendo relatados inúmeros casos de sucesso da inoculação de BPCV, sobre a produtividade das culturas, o crescimento de plantas e a supressão de doenças, a utilização desses microrganismos como inoculantes nem sempre tem fornecido bons resultados. Um dos principais obstáculos para sua utilização comercial mais ampla é que os isolados introduzidos podem ter dificuldade de se estabelecer e sobreviver sob condições de campo (ATKINSON; WATSON, 2000).

As interações entre BPCV com plantas podem ser instáveis, e a variabilidade no desempenho de BPCV pode ser devida a fatores ambientais bióticos e abióticos que afetam o crescimento, a sobrevivência e o efeito que exercem sobre a planta. Entre os fatores ambientais estão: temperatura, umidade do solo, pH e matéria orgânica do solo, as características ou a composição do solo e a atividade da microbiota nativa do solo (STRIGUL; KRAVCHENKO, 2006).

Segundo Lucy et al. (2004), as BPCV apresentam uma alternativa ao uso de produtos químicos, contribuindo com o crescimento das plantas em muitas aplicações diferentes. Extensas investigações têm demonstrado que as BPVC têm um papel importante na agricultura, na horticultura e na melhoria da produtividade das culturas.

A maior necessidade para o uso de BPCV é uma definição clara de quais bactérias são úteis e necessárias para diferentes condições ambientais e espécies vegetais, para que possam ser selecionadas cepas eficientes. Além disso, uma melhor compreensão dos fatores que facilitam a persistência ambiental dessas bactérias deve ser estudada visando à identificação das condições ambientais onde estas bactérias possam ser aplicadas visando a maior viabilidade das células após a inoculação.

Os efeitos benéficos dos microrganismos do solo têm sido estudados para várias espécies vegetais. O girassol é uma das culturas oleaginosas mais importantes que apresenta grande importância econômica e agrônômica. Os trabalhos realizados visando identificar os microrganismos associados ao girassol são poucos (FAGES; ARSAC, 1991; HANADA; ROMEIRO, 1998; FORCHETTI et al. 2007), entretanto esses dados demonstram a importância da identificação desses microrganismos e dos efeitos que a inoculação desses possam trazer a esta cultura.

2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos são essenciais para o funcionamento e sustentabilidade de todos os ecossistemas naturais. O Brasil é reconhecido como um dos países que apresenta um dos mais elevados índices de biodiversidade animal e vegetal, entretanto, os dados sobre a diversidade microbiana brasileira são escassos ou até mesmo inexistentes (PROSSER, 2002; THOMPSON et al., 2005).

Existe em todo o mundo uma crescente procura por microrganismos com potencial biotecnológico, visando à produção de fármacos, diminuição do uso de insumos agrícolas como os fertilizantes e agroquímicos, além de muitos outros produtos derivados que se encontram praticamente inexplorados.

A compreensão da diversidade microbiana mudou devido às análises de DNA presentes no ecossistema e através do sequenciamento do DNA isolado diretamente do ambiente é possível inferir as relações evolutivas entre os microrganismos (BULL et al., 2000; THOMPSON et al., 2005).

A preservação e classificação apropriada dos microrganismos são imprescindíveis para que a diversidade seja convenientemente utilizada e mantida. O termo diversidade para a biologia é geralmente utilizado para descrever o número de espécies presentes em um habitat (FAORO, 2006). Em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de seqüências de DNA encontradas no ambiente (LIESACK et al., 1997; TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

O cultivo de células bacterianas em laboratório, em meio sólido para obter colônias isoladas, a partir das quais são realizados testes bioquímicos e fenotípicos, auxiliam na identificação das espécies (PROSSER, 2002), mas não fornecem informações sobre as relações evolutivas entre os organismos, o que deveria ser a base para um sistema de classificação (HUNGENHOTLZ; PACE, 1996); geralmente esses dados agrupam organismos que são essencialmente diferentes (PACE, 1997).

Com o advento das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI et al., 1988) e sequenciamento de DNA (SANGER et al., 1977), os métodos moleculares, especialmente aqueles baseados no estudo da seqüência do

16S rDNA, oferecem novas oportunidades para a análise da estrutura e composição de espécies de comunidades microbianas. As técnicas que se baseiam na amplificação do 16S rDNA por PCR, e posterior caracterização por clonagem e sequenciamento, têm sido exploradas para inferir relações filogenéticas entre os microrganismos (MUYZER et al., 1993; DERAKSHANI et al., 2001; MASSINI, 2009).

Outros métodos para estudo global de comunidades microbianas consistem na análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA), no polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (TRFLP), na amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), na análise do espaço ribossomal intergênico (RISA), na eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e na eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) (KIRK et al., 2004; FAORO, 2006).

As sequências de RNAs ribossômicos (RNAr) ocupam uma posição central no estudo da evolução e ecologia dos microrganismos. Devido à onipresença das moléculas de RNAr em todas as formas de vida celular, a análise comparativa de suas sequências pode ser aplicada universalmente para inferir relações filogenéticas entre organismos (HEAD et al., 1998; TOLEDO et al. 2009).

As sequências do gene 16S rDNA se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD et al. 1998). A escolha do gene 16S rDNA decorreu do fato deste apresentar todas as características necessárias a um marcador molecular ideal, pois possui uma distribuição universal, com estrutura e função conservadas entre os *taxa* e um tamanho grande o suficiente que permita o aparecimento de divergências na sequência (LUDWIG; SCHLEIFER, 1994; FAORO, 2006).

As análises comparativas da estrutura primária dos genes de rDNA transformaram a taxonomia microbiana de um simples sistema de identificação para um sistema estruturado, sendo possível deduzir as relações filogenéticas e evolutivas entre bactérias, arqueobactérias e eucariotos através da comparação das seqüências (WEISBURG et al. 1990; OLSEN et al. 1994).

A disponibilidade de um grande número de seqüências do gene 16S rDNA depositadas em banco de dados (por exemplo: *Ribosomal Data Bank Project*),

aliada ao fato de que é possível aplicar a PCR para a amplificação de genes 16S rDNA de eubactérias com taxonomia diversa, com um pequeno número de oligonucleotídeos, tem permitido que essa informação molecular seja amplamente utilizada para o agrupamento filogenético (WEISBURG et al., 1991; TEIXEIRA, 2003).

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas na detecção de variabilidade genética ou polimorfismo genético de organismos, denominados genericamente de marcadores moleculares. Os marcadores são características que diferem dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Um marcador genético pode ser a expressão de uma característica, uma proteína, ou mesmo um fragmento de DNA que pode ou não codificar um gene (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2006).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular têm fornecido a base para a descoberta de um número ilimitado de marcadores de DNA. A utilidade de marcadores baseados em DNA geralmente é determinada pela tecnologia que é utilizada para revelar o polimorfismo do DNA (BARDAKCI, 2001).

A técnica de RAPD (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso), sendo uma variação do protocolo de PCR, baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma dirigidas por pequenos oligonucleotídeos sintéticos de seqüência arbitrária. Como um mesmo oligonucleotídeo pode-se complementar a diferentes regiões do genoma que se amplificam simultaneamente, assim existe a possibilidade de produção de vários fragmentos. Os polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado, quando comparado à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo (BARDAKCI, 2001; CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2006).

Devido à simplicidade e baixo custo da técnica de RAPD, foi encontrada uma grande variedade de aplicações a muitas áreas da biologia, como estudos de sistemática, evolução e construção de mapas genéticos. A maior preocupação em relação à técnica é sua sensibilidade a mudanças nas condições de reação, o que gera problemas de reprodutibilidade (BARDAKCI, 2001).

Na literatura há poucos trabalhos com o objetivo de caracterizar microrganismos associado ao girassol (HANADA; ROMEIRO, 1998; FORCHETTI, et

al. 2007). Através do uso de ferramentas moleculares é possível analisar a diversidade genética visando à caracterização da comunidade microbiana associada à cultura do girassol, buscando identificar espécies relevantes para utilização como insumo agrícola, fornecendo subsídios ao manejo da cultura do girassol, como também o maior entendimento da funcionalidade da associação entre o girassol e bactérias promotoras de crescimento vegetal.

3 OBJETIVO

Isolar, identificar a diversidade genética e caracterizar por técnicas bioquímicas parte da comunidade bacteriana associada à cultura do girassol, buscando identificar os isolados capazes de atuar na promoção de crescimento vegetal.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter isolados bacterianos representantes da comunidade associada a diferentes regiões de plantas de girassol: rizosfera, raízes, colmo e capítulo.

Avaliar a diversidade genética dos isolados obtidos do girassol através da técnica de RAPD.

Sequenciar o gene 16S rDNA dos isolados visando a classificação taxonômica.

Avaliar o potencial de promoção de crescimento vegetal dos isolados obtidos do girassol quanto à produção de auxinas, produção de proteínas, solubilização de fosfatos, produção de quitinases, produção de sideróforos, atividade antagonista e FBN.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E MEIO DE CULTIVO UTILIZADOS PARA ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

As amostras de girassol foram obtidas de plantios experimentais realizados no campo experimental da Embrapa Soja (Londrina-PR). Cinco plantas de girassol das cultivares Helio 251 e Aguará 3 foram coletadas no estágio R4 (início da formação do capítulo) e transportadas ao laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina. Após lavagem em água corrente, a superfície dos tecidos das plantas foi esterilizado através da imersão em hipoclorito de sódio 2 % por 15 min e, posteriormente, as plantas foram lavadas com água destilada estéril e separadas em raízes, colmo e capítulo. O solo aderido às raízes foi coletado antes da lavagem das plantas e constituiu o solo rizosférico.

Cada região da planta foi manipulada em fluxo laminar, onde cerca de 5 g dos tecidos internos foram coletados com o auxílio de lâmina estéril. A porção vegetal compreendendo o interior do colmo e do capítulo foi considerado como ambiente endofítico. Este material foi macerado em solução salina estéril (NaCl 0,9 %) até a obtenção de uma suspensão homogênea. As raízes, pesadas (5 g) e maceradas, e o solo rizosférico (5 g) foram também suspensos em solução salina. Foram realizadas diluições seriadas até 10^{-7} , e as diluições obtidas 10^{-2} a 10^{-7} foram plaqueadas (0,1 mL) em meio de cultivo sólido Dygs (Anexo A) (RODRIGUES NETO et al., 1986). As placas inoculadas foram incubadas a 28 °C de 7 a 8 dias, a contagem de bactérias foi realizada pelo método do número mais provável (NMP) ou pelo método de unidades formadoras de colônias (UFC). As colônias de bactérias e películas formadas na diluições elevadas foram repicadas em meio Dygs para purificação.

Os isolados obtidos após o isolamento e purificação em meio de cultura foram identificados e armazenados em Dygs : glicerol (1 mL de meio Dygs e 1 mL de glicerol autoclavado) a - 20 °C.

4.2 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

4.2.1 Extração do DNA genômico total

A extração de DNA foi realizada segundo o método de Sambrook et al. (1989) modificado.

As células foram crescidas em 5 mL de meio Dygs por 24 horas a 28 °C e, após o crescimento, 2 mL da suspensão bacteriana foram centrifugadas em tubos eppendorf com capacidade para 2 mL a 13.200 rpm por 2 min. O pellet foi lavado com NaCl 0,85%, centrifugado a 13.200 rpm por 3 min e então ressuspensos com 100 µL de TE (50 mM Tris/HCl [pH 7,6] e 20 mM EDTA), SDS 1% e 5 µL de proteinase K. Após agitação em vórtex, a suspensão de células foi aquecida em estufa a 75 °C por 10 minutos para lise celular e, em seguida, resfriadas a – 20 °C por 2 min. Para precipitar as proteínas foi adicionado 62,7 µL de Acetato de Amônio 7,5 M, seguido de agitação e centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos.

Em seguida, o DNA foi separado da fase orgânica pela adição de 500 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), seguido de homogeneização manual e centrifugação (13.200 rpm por 10 min). O sobrenadante foi transferido (500 µL) para novos tubos eppendorf e a fase aquosa removida adicionando o mesmo volume (500 µL) de Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após a separação das fases, 400 µL do sobrenadante foi transferido para novos tubos eppendorf e o DNA precipitado pela adição de 360 µL de isopropanol, com incubação a – 20 °C por até 2 horas ou a –80 °C por 15 minutos, seguido de centrifugação (13.200 rpm por 15 minutos). O precipitado foi lavado com 400 µL de etanol 70 % gelado, centrifugado (13.200 rpm por 5 min), seco em corrente de ar (câmara de fluxo laminar) por 1 hora e ressuspensão em 40 µL de água ultrapura estéril.

A presença e integridade do DNA foram analisadas em gel de agarose 0,9 % por eletroforese, corado com brometo de etídeo. Para quantificar o DNA extraído foi utilizado como padrão escalas de 85, 170, 255, 340 e 425 ng de Lambda DNA (Promega).

4.2.2 Análise da variabilidade genética por Marcadores de RAPD-PCR

Para análise de RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) foram utilizados iniciadores arbitrários M13, P2, P3 e 1254 (Tabela 1). As reações foram realizadas com volume final de 50 μL contendo: 2 μL de DNA (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 5 μL de tampão 10x (10mM Tris-HCL pH 8,3), 2,5 μL de MgCl_2 (10 mM), 2 μL de dNTPs (2,5 mM de cada), 2,5 μL de cada iniciador (20 pmol), 1,5 U de Taq DNA polimerase (5 U/ μL) (Invitrogen) e 35,7 μL de H_2O ultrapura estéril. Como controles negativo foram realizados reações omitindo-se o DNA genômico. A mistura da reação foi submetida ao termociclador BIOER-TC-96-G-H(b).

A reação de amplificação seguiu com uma etapa de desnaturação inicial (94° C, 5 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 segundos), anelamento do iniciador (36 °C, 2 min) e extensão (72 °C, 3 min). Após amplificação, 8 μL de cada amostra foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2 % em tampão TBE 1X corado com brometo de etídeo.

Os padrões de bandas obtidos pela amplificação por RAPD foram fotografados digitalmente, e os dados foram analisados usando o software GelQuest[®] (versão 2.1.2). O polimorfismo dos isolados foi avaliado pela presença e ausência de bandas atribuindo o valor 1 (presença) e 0 (ausência). Com base nesses dados foi construída uma matriz binária. A análise de agrupamento e similaridade foi estimada pelo coeficiente de Jaccard com a opção UPGMA, os dados foram processados no programa NTSYS-pc (versão 2.1) e os isolados foram agrupados e representados graficamente por dendrograma.

Tabela 1- Iniciadores arbitrários utilizados para análise de RAPD, seqüência de nucleotídeo e referências.

INICIADOR	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
M13	GAG GGT GGC GGT TCT	STENLID et al (1994)
P2	GGT GAC GCA G	MANGIN et al. (1999)
P3	CTG CTG GGA C	MANGIN et al. (1999)
1254	CCG CAG CCA A	AKOPIANZ et al. (1992)

4.2.3 Amplificação da subunidade ribossomal 16S rRNA por PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

A amplificação das seqüências 16S rRNA dos isolados foi realizada com os iniciadores 27f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e 778r (3' AGG GTA TCT AAT CCT GTT TGC 5') (SUZUKI; GIOVANNONI, 1996; ROSCH; BOTHE, 2005).

Para reação de PCR foram utilizadas 50 ng de DNA dos isolados, 2 µL de cada iniciador, 2 uL de dNTPs (2,5 mM de cada), 5 µL de tampão 10x (10mM Tris-HCL pH 8,3), 2,5 µL de MgCl₂, 1,5 U de Taq DNA polimerase e 35,2 µL de H₂O ultrapura estéril. A reação de amplificação seguiu com uma etapa de desnaturação inicial (94 °C, 5 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94 °C, 20 segundos), anelamento (58 °C, 30 segundos) e extensão (72 °C, 1 min).

Após amplificação, 5 µL de cada amostra foi avaliado 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 (750 pares de base) foram tratadas utilizando o kit PureLink™ PCR Purification (Invitrogen™) para reação de sequenciamento.

4.2.4 Reação de sequenciamento

Após purificação, os fragmentos amplificados pela reação de PCR da subunidade ribossomal 16S rDNA foram utilizados para reação de sequenciamento. Deste material foram utilizados de 2 a 5,5 µL nas reações PCR para o sequenciamento, utilizando iniciadores internos ao fragmento amplificado. A reação de sequenciamento foi feita utilizando o “kit” comercial DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing KIT (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.). A reação de amplificação seguiu com uma etapa de desnaturação (94 °C, 30 segundos) e extensão (60 °C, 2 min) e o sequenciamento realizado no seqüenciador automático MegaBace 1000.

As seqüências foram alinhadas usando o programa Clustal W 2.0.12 (Larkin et al., 2007) e corrigida manualmente usando BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999).

As seqüências obtidas foram submetidas à comparação com o coeficiente de similaridade do Ribosomal Database Project (RDP) (MAIDAK et al. 1997) e o algoritmo BLASTN 2.0.6 (ALTSCHUL et al., 1997) para o posicionamento e identificação das seqüências dos genes ribossomais dos isolados.

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS

4.3.1 Avaliação da capacidade de fixação biológica do nitrogênio

Os isolados foram crescidos em meio sólido Dygs e repicados em meio de cultivo semi-sólido sem nitrogênio. Foram utilizados tubos de penicilina contendo 4 mL de meio de cultura semi-sólido NFb (DÖBEREINER et al., 1995) (Anexo B), onde os isolados do girassol e a cultura-padrão de *Azospirillum brasilense* ABV5 foram inoculados, com alça de platina, a partir de culturas crescidas por 48 horas. Os frascos foram tampados com boneca de gaze e algodão hidrofóbico, a extremidade envolta com filme PVC e os frascos incubados a 28 °C por 96 horas.

A formação de uma zona visível de maior crescimento bacteriano abaixo da superfície do meio foi interpretada como resultado positivo nesta avaliação, que foi realizada aos quatro dias de incubação. Os isolados que apresentaram a formação da película foram repicados por cinco vezes consecutivas em meio NFb semi-sólido para comprovação do crescimento em meio livre de nitrogênio, avaliados nas mesmas condições.

4.3.2 Avaliação da atividade antagonista dos isolados contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* foi cultivado em meio de cultura BDA (ágar batata dextrose) a temperatura ambiente por 7 dias, e os isolados cultivados em meio Dygs sólido por 48 horas a 28 °C. O ensaio de atividade antagonista foi realizado em placas de petri contendo meio Dygs, onde uma alça dos isolados foi repicada em uma das extremidades da placa e uma alça do micélio do fungo *S. sclerotiorum* na outra extremidade. Como controle positivo, o fungo foi repicado na ausência da bactéria em uma das extremidades da placa contendo meio Dygs.

As placas foram incubadas a temperatura ambiente no escuro por 10 dias e as avaliações do crescimento micelial do fungo realizadas empregando os critérios propostos por Bell et al. (1982) modificada com escalas de notas: 1 (antagonista cresce por toda a placa de petri), 2 (patógeno não se aproxima do antagonista por 1 cm ou mais na placa), 3 (antagonista cresce sobre 2/3 da placa), 4 (antagonista e patógeno crescem até metade da placa), 5 (patógeno cresce sobre 2/3 da placa), 6 (patógeno cresce por toda a placa de petri). Os Isolados que apresentaram nota 2 foram repicados novamente sobre as mesmas condições para comprovar os resultados.

Para comprovar os resultados obtidos nesta avaliação os isolados que apresentaram atividade antagonista foram crescidos em meio Dygs líquido por 24 horas a 28 °C. O fungo *S. sclerotiorum* foi crescido em meio BDA por 10 dias a

temperatura ambiente. O ensaio de atividade antagonista foi realizado em placas de petri contendo meio Dygs, onde 4 esferas de 5 mm do micélio do fungo foram inoculados em 4 pontos eqüidistantes na placa e após 30 horas de incubação foi inoculado no centro da placa 30 µL da cultura dos isolados. Após 7 dias de incubação em temperatura ambiente, foi medido o halo de inibição dos isolados contra o fungo para comprovar a atividade antagonista. Como controle positivo 4 esferas de 5 mm do micélio do fungo foram inoculados no meio Dygs e incubado nas mesmas condições de ensaio.

4.3.4 Produção de quitinase e determinação da atividade quitinásica

Os isolados foram crescidos por 5 dias a 28 °C em meio contendo quitina em pó, segundo proposto por Monreal e Reese, (1969) (Anexo C). Após o crescimento as células foram centrifugadas por 8.000 rpm por 5 min, para obter o extrato livre de células (ELC).

O meio reacional contendo enzima-substrato foi preparado com 0,6 mL de quitina coloidal 1 %, 0,4 mL de tampão McIlvaines pH 6,0 e 0,5 mL do ELC, incubados sob agitação durante 1 hora a 40 °C. O branco foi constituído por 1,0 mL de substrato e 0,5 mL de tampão, e o controle 1,0 mL de tampão e 0,5 mL do ELC. A reação foi interrompida em banho a 100 °C por 3 min e centrifugada a 1.500 rpm por 15 min.

Foram utilizados 0,25 mL (padrões; amostras; controles) adicionados de 50 µL de tetraborato de sódio 0,8 M, pH 8,9 a 100 °C durante 3 min. Após o resfriamento foi adicionado 1,5 mL do reativo de Erlich levando a temperatura de 37 °C durante 20 min, em seguida resfriando a temperatura ambiente. A absorbância em espectrofotômetro foi medida no comprimento de onda em 585 nm para a determinação do teor de *N*-acetilglicosamina.

A curva de calibração foi realizada com as seguintes concentrações de *N*-acetilglicosamina (µg/mL): 0; 4; 10; 20; 40; 60; 80 e 100. O teor de *N*-acetilglicosaminas foi determinado pelo método de Morgan-Elson para hexosaminas

(CHAPLIN; KENNEDY, 1994) utilizando como padrão *N*-acetilglicosamina 100 µg/mL.

Uma unidade de atividade enzimática (UA) foi definida como a quantidade de *N*-acetilglicosamina (µg/mL) liberada por minuto nas condições descritas.

4.3.5 Solubilização de fosfatos

Para avaliar a capacidade de solubilização de fosfatos pelos isolados, foi realizado o cultivo de cada um dos isolados em meio sólido contendo fosfato insolúvel e o indicador de pH azul de bromofenol (Anexo D), segundo Nautiyal (2002). Os isolados foram repicados e incubados a 28 °C durante 7 dias, em seguida foram realizadas as avaliações. Os experimentos foram feitos em triplicatas e a presença de um halo claro em torno da colônia indicou a solubilização do fosfato.

As avaliações foram realizadas pela metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), determinando-se o índice enzimático (IE), pela relação:

$$\text{IE} = (\text{Diâmetro do halo de degradação da bactéria}) / (\text{Diâmetro da colônia da bactéria})$$

4.3.6 Produção e determinação de auxinas

A produção de compostos indólicos foi quantificada por colorimetria utilizando o reagente de Salkowisk (SARWAR; KREMER, 1995). As células foram crescidas em 5 mL de meio Dygs acrescido de DL-triptofano (100 µg. mL⁻¹) (Merck) por 24 horas, 100 rpm a 28 °C. Uma alíquota de 2 mL foi coletada, as células foram centrifugadas (8.000 rpm; 5 min) e o sobrenadante utilizado nas reações. A reação foi realizada em tubos de vidro, onde 1 mL do sobrenadante reagiu com 2 mL do reagente de Salkowski (1 mL de FeCl₃.6H₂O 0,5M em 50 mL de HClO₄ 35 %). Após 25 minutos de reação no escuro, a intensidade da coloração foi medida a 540 nm

em espectrofotômetro FEMTO 600 *plus*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A quantidade de auxina foi determinada utilizando uma curva padrão com concentrações crescentes (0 a 200 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$) de ácido-3-indol acético sintético 99% (Acros-Organics) de acordo com a equação em relação a absorbância pela concentração $y = 225,43x + 1,1909$ ($R^2 = 0,9997$).

4.3.7 Determinação de proteínas

O teor de proteínas total foi determinado para normalizar as leituras de produção de auxinas. Para determinação de proteínas foi utilizado o mesmo cultivo do ensaio de determinação de auxinas. Uma alíquota de 1 mL das culturas foi coletado e adicionado 1 mL de NaOH 0,1M. As amostras foram agitadas e incubadas por 15 min a 90 °C para lise celular. A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando como padrão soroalbumina bovina 1,0 mg/mL.

4.3.8 Produção de sideróforos

Para identificar os isolados com habilidade de produção de sideróforos em placas de Petri foi utilizada a metodologia proposta por Schwyn e Neilands (1987), modificada. Três soluções foram preparadas, 60,5 mg de Cromoazurol S foi dissolvido em 50 mL de água ultrapura, solução de ferro III, contendo 1 mM de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10 mM de HCl dissolvidos em 10 mL de água ultrapura e 72,9 g de CTAB (Hexadeciltrimetilamonio-brometo) dissolvido em 40 mL de água ultrapura. Estas soluções foram autoclavadas separadamente.

Foi preparado 1 L de meio Dygs sólido acrescido das soluções de Cromo azurol S, CTAB e Ferro III. Todas as vidrarias utilizadas foram enxaguadas com água ultrapura para minimizar o ferro contaminante. Uma gota dos isolados crescidos em meio Dygs sólido por 24 horas a 28 °C foram inoculados nas placas

contendo meio Dygs suplementado com as 3 soluções e incubados por 3 dias a 28 °C no escuro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A detecção da coloração laranja ao redor das colônias foi assumida como habilidade para produção de sideróforos pelo isolado. Para identificar os isolados com maior habilidade de produção de sideróforos foi determinada a razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ORIGEM E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS DO GIRASSOL

O total de 57 isolados foram obtidos das amostras da rizosfera, raiz, capítulo e colmo das plantas de girassol das cultivares Helio 251 e Aguará 3 (Tabelas 2 e 3). Nenhuma diferença significativa na densidade de bactérias foi observada entre as duas cultivares. No entanto, a rizosfera da cultivar Aguará 3 apresentou a maior densidade bacteriana populacional (maior que $8,9 \times 10^6$ UFC por grama), enquanto que o capítulo dessa mesma cultivar apresentou a menor densidade populacional ($2,3 \times 10^4$ UFC por grama).

Foram obtidos 40 isolados da cultivar Helio 251, compreendendo 17 isolados da rizosfera, 10 isolados da raiz, 7 isolados do colmo e 6 isolados do capítulo. E 17 isolados da cultivar Aguará 3, sendo 1 isolado da rizosfera, 3 isolados da raiz, 7 isolados do colmo e 6 isolados do capítulo. Os isolados foram codificados de acordo com a região de origem, e as placas que apresentaram mais de um tipo de bactéria geraram mais de uma identificação.

Tabela 2- Origem de isolamento e codificação dos isolados obtidos da cultivar de girassol Helio 251.

Cultivar	Região	Código	Cultivar	Região	Código
Helio 251	Rizosfera	Z-A	Helio 251	Rizosfera	ZR-S
Helio 251	Rizosfera	Z-B	Helio 251	Raiz	R-F
Helio 251	Rizosfera	Z-B'	Helio 251	Raiz	R-J
Helio 251	Rizosfera	Z-B''	Helio 251	Raiz	R-A
Helio 251	Rizosfera	Z-C	Helio 251	Raiz	R-B
Helio 251	Rizosfera	Z-D	Helio 251	Raiz	R-D
Helio 251	Rizosfera	Z-E	Helio 251	Raiz	R-E
Helio 251	Rizosfera	Z-F	Helio 251	Raiz	R-K
Helio 251	Rizosfera	Z-F'	Helio 251	Raiz	R-M
Hélio 251	Rizosfera	Z-H	Helio 251	Raiz	R-O
Helio 251	Rizosfera	Z-J	Helio 251	Colmo	C-A
Helio 251	Rizosfera	Z-K	Helio 251	Colmo	C-B
Helio 251	Rizosfera	Z-L	Helio 251	Colmo	C-K
Helio 251	Rizosfera	Z-M	Helio 251	Colmo	C-K'
Helio 251	Rizosfera	ZR-G	Helio 251	Colmo	C-K''
Helio 251	Colmo	C-L	Helio 251	Capítulo	T4AL-II
Helio 251	Colmo	C-M	Helio 251	Capítulo	TSAA
Helio 251	Capítulo	T4AE	Helio 251	Capítulo	TSAB
Helio 251	Capítulo	T4AL-I	Helio 251	Capítulo	TSAD

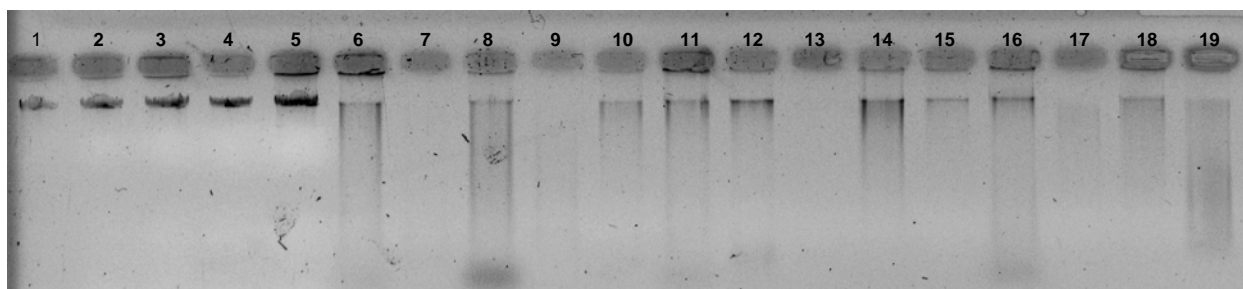
Tabela 3- Origem de isolamento e codificação dos isolados obtidos da cultivar de girassol Aguará 3.

Cultivar	Região	Código	Cultivar	Região	Código
Aguará 3	Raiz	R-C	Aguará 3	Colmo	C-H
Aguará 3	Raiz	R-IG	Aguará 3	Colmo	C-J
Aguará 3	Raiz	R-IA	Aguará 3	Capítulo	T1AH
Aguará 3	Rizosfera	R-P	Aguará 3	Capítulo	T1AG
Aguará 3	Colmo	CC-B	Aguará 3	Capítulo	T2AF
Aguará 3	Colmo	CC-R	Aguará 3	Capítulo	T2AJ-I
Aguará 3	Colmo	C-D	Aguará 3	Capítulo	T2AJ-II
Aguará 3	Colmo	C-E	Aguará 3	Capítulo	T3AI
Aguará 3	Colmo	C-F			

5.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO TOTAL

O perfil eletroforético do DNA extraído (Figura 1) apresentou variações na quantidade de DNA, sendo necessário realizar diluições para obtenção de 50 ng/μL de DNA para realizar a as amplificações de PCR e RAPD. As amostras apresentaram concentrações entre 85 ng e 300 ng de DNA/μL. Algumas amostras de DNA apresentaram excesso de RNA, sendo esse retirado aplicando 1 μL da enzima RNase (20 mg/mL).

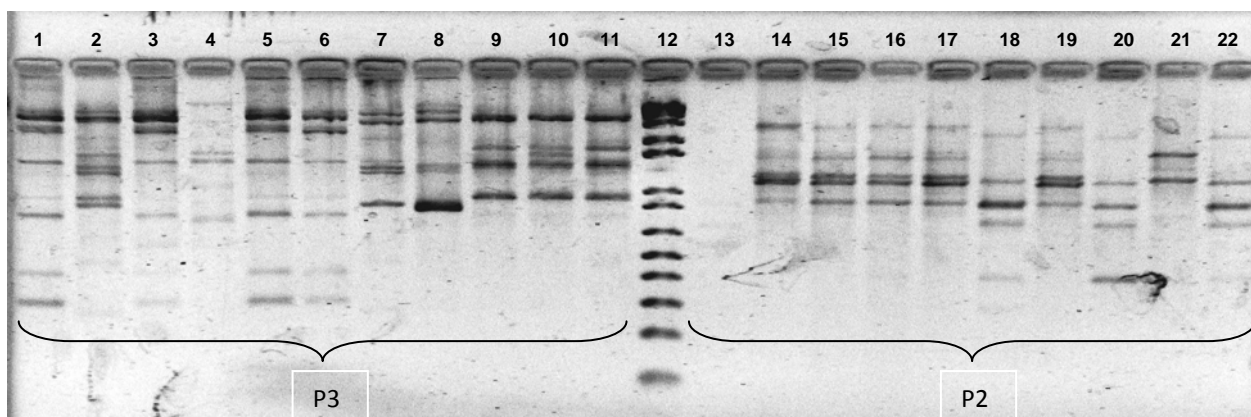
Figura 1- DNA extraído dos isolados submetido eletroforese em gel de agarose 1%, 85 V por 45 minutos, corado com brometo de etídeo. Linhas 1 a 5 padrões de DNA λ (ng/μL) 85, 170, 300, 255 e 425, Linhas 6 a 19 isolados CA, CB, CC, CD, CR,CF, CH, CJ, CK, CK', CK'', CL, CM e TSAB.



5.3 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES DE RAPD-PCR

A técnica de RAPD-PCR foi utilizado para comparar a redundância genotípica entre os isolados. Os resultados da amplificação com os iniciadores arbitrários P2 e P3 dos isolados estão exemplificados na Figura 2. Um total de 128 marcadores de RAPD foram obtidos com os quatro iniciadores utilizados. Fragmentos polimórficos variando de 100 até 5000 pb foram obtidos, permitindo a construção de uma matriz binária avaliando-se a presença e ausência de bandas. Através do dendrograma (Figura 3) obtido foi possível observar uma ampla diversidade entre os isolados, e que estes foram agrupados com alta similaridade de acordo com o tecido vegetal de origem.

Figura 2- Produto da amplificação por RAPD com iniciadores P2 e P3 submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, 85 V por 120 minutos, corado com brometo de etídeo.



Linha 1 a 11, isolados ZG, ZF", ZF, ZE, ZD, ZC, ZB", ZB', ZB, ZA, ZK, linha 12 marcador molecular KB, linha 13 controle -, linhas 14 a 22 CB, CCB, CCR, CK, T2AJII, T2AF e T2AJI.

A técnica de RAPD pode ser utilizada para avaliar a diversidade genética dentro de grupos de microrganismos e associá-las ao nicho ocupado. Os isolados foram agrupados em 4 grupos distintos com aproximadamente 60% de similaridade (Figura 3), foi possível observar que os isolados da rizosfera e raiz foram agrupados nos grupos 1 e 2, não sendo observado a presença de isolados de outras regiões de isolamento nesses grupos. E nos grupos 3 e 4 a presença de

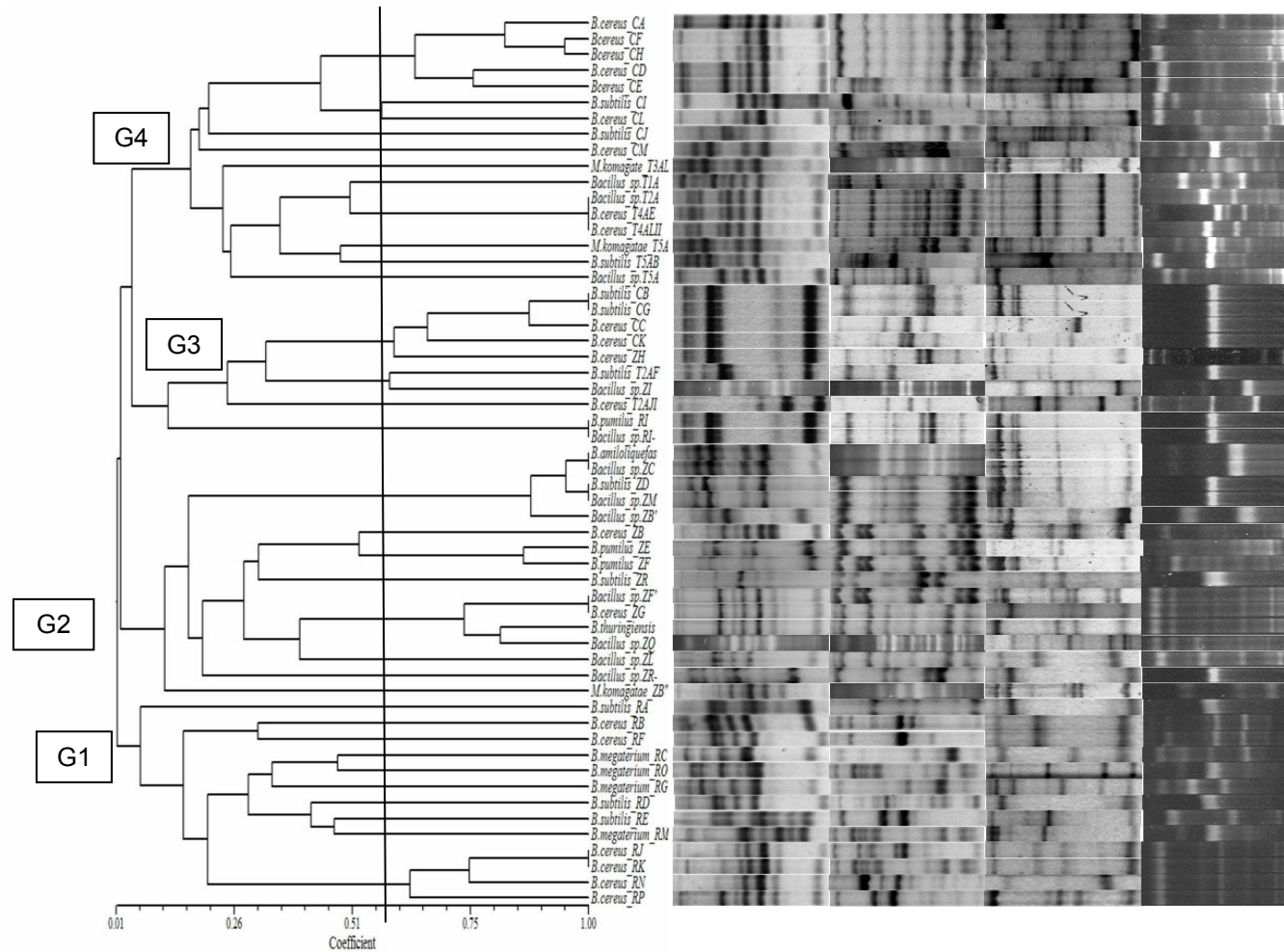
isolados do colmo e do capítulo das cultivares de girassol. Através do dendrograma foi possível observar que os isolados da parte aérea das plantas e da raiz e rizosfera foram separados em grupos distintos.

Através da reação de PCR-RAPD foi possível observar que os isolados do capítulo T2AJ, T4AE e T4ALII, os isolados da rizosfera ZF' e ZG, ZD e ZM, e os isolados da raiz, RJ e RK, RI-G e RI-A apresentaram perfis eletroforéticos idênticos, sendo estes agrupados com 100 % de similaridade no dendrograma genético.

Araújo et al. (2001) isolaram fungos e bactérias da superfície foliar de diversos porta enxerto de citrus. Entre as principais espécies de bactérias isoladas foram *Bacillus spp.* (incluindo *B. cereus*, *B. lentus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. subtilis*). As espécies isoladas mais frequentes encontradas foram *P. agglomerans* e *B. pumilus*. A variabilidade genética entre os 36 isolados de bactérias endofíticas foi analisado pela técnica de RAPD, que indicaram que isolados de *B. pumilus* foram mais diversificadas do que isolados de *P. Agglomerans*. Os dados mostraram que não houve correlação entre os grupos obtidos por meio de marcadores RAPD e as plantas hospedeiras a partir da qual as bactérias endofíticas foram isoladas.

Os resultados confirmaram que a composição das populações de bactérias com capacidade de colonizar o girassol foram afetadas pelo genótipo das plantas. A influência do genótipo sobre a composição dos endofíticos e rizosférico comunidades bacterianas é encontrado para espécies de diferentes plantas (HAICHAR et al., 2008).

Figura 3- Dendrograma genético dos isolados de tecidos de girassol, após a análise dos perfis eletroforéticos obtidos pela técnica de RAPD. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e coeficiente de Jaccard



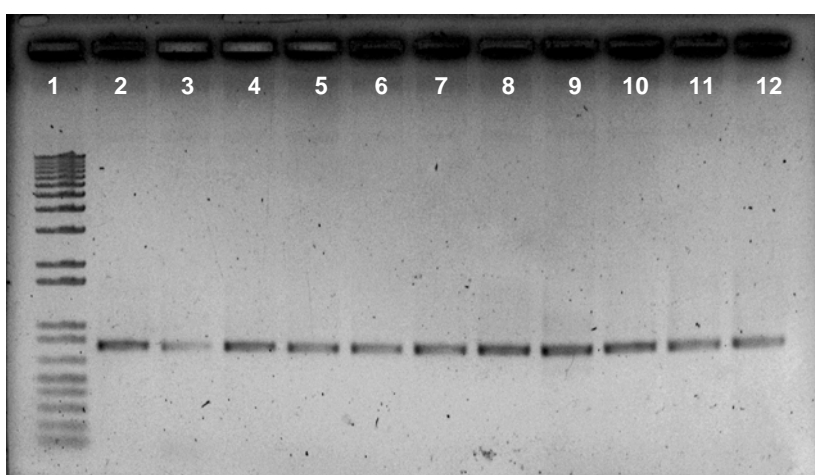
5.4 AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE RIBOSSOMAL 16S rDNA POR PCR

Os resultados da amplificação do gene 16S rDNA pelo iniciadores 27F e 778R dos isolados CA, CB, CC, CD, CE, CF, CH, CJ, CK, CK' e CK'' estão exemplificados na Figura 4. A amplificação do gene ribossomal 16S de microrganismos é amplamente utilizado em investigações genéticas por demonstrar regiões altamente conservadas.

Os resultados da amplificação do gene 16S rDNA demonstrou um padrão de banda com cerca de 700 pares de bases em comum para todos os isolados. O produto amplificado de todos os isolados foi purificado e submetido à reação de sequenciamento.

Análises de seqüências do DNA ribossomal têm sido amplamente utilizadas para estudar relações filogenéticas entre microrganismos, bem como para identificação taxonômica (WOESE, 1987). Utilizando iniciadores conservados o gene 16S rDNA pode ser facilmente amplificado por PCR, não só a partir de culturas puras, mas também diretamente a partir de amostras ambientais (GIOVANNONI et al., 1990).

Figura 4- Produto da amplificação por PCR do gene 16S rDNA, com iniciadores 27F e 778R submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, 90 V por 70 minutos, corado com brometo de etídeo.



Linha 1 Marcador Molecular KB, Linha 2 a 12 isolados CA, CB, CC, CD, CE, CF, CH, CJ, CK, CK', CK''.

A análise das seqüências dos genes ribossomais permite a identificação dos microrganismos no nível de gênero e possivelmente no nível de espécie. A amplificação da subunidade 16S rDNA dos isolados demonstrou que todos apresentam o gene conservado e possibilitou a identificação taxonômica dos isolados de girassol.

5.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do gene 16S rDNA permitiu classificar 42 isolados obtidos ao nível de gênero. A grande maioria dos isolados foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus*, compreendendo as espécies *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* e *Bacillus* sp. Somente 3 isolados obtidos foram classificados fora do gênero *Bacillus*, sendo identificada como *Methylobacterium* sp (Tabela 4). Os 12 isolados não identificados apresentaram seqüências com baixa qualidade, e os contigs dessas seqüências não puderam ser montados.

De maneira geral, o grupo mais comum de bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais é composto por *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*) e por *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*) (HALLMANN et al., 1997). De acordo com Silva et al. (2006) é possível que, em países tropicais como o Brasil, a diversidade de bactérias endofíticas em associação com plantas seja ainda maior e, possivelmente, com predominância de outros grupos de microrganismos.

Tabela 4- Identificação de isolados de ambiente rizosférico e endofítico (raízes, colmos e capítulo) de bactérias promotoras de crescimento associadas ao girassol. Identidade por homologia à seqüência parcial do gene 16S rDNA.

Isolado	Origem quanto ao isolamento (cultivar)	Número acesso^a	Gênero^b	Espécie mais provável^c
CA	Colmo girassol (Helio 251)	HM061667	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
CB	Colmo girassol (Helio 251)	HM061673	<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
CC	Colmo girassol (Aguará 3)	HM061679	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
CD	Colmo girassol (Aguará 3)	HM061684	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
CE	Colmo girassol (Aguará 3)	HM061689	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CF	Colmo girassol (Aguará 3)	HM061650	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
CH	Colmo girassol (Helio 251)	HM061656	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
CI	Colmo girassol (Aguará 3)	HM061657	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
CJ	Colmo girassol (Aguará 3)	HM061662	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>
CK	Colmo girassol (Helio 251)	HM061674	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
CK"	Colmo girassol (Helio 251)	HM061651	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
CL	Colmo girassol (Helio 251)	HM061668	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
CM	Colmo girassol (Helio 251)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
RA	Raízes girassol (Helio 251)	HM061691	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
RB	Raízes girassol (Helio 251)	HM061652	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
RC	Raízes girassol (Aguará 3)	HM061658	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
RD	Raízes girassol (Helio 251)	HM061664	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
RE	Raízes girassol (Helio 251)	HM061670	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
RF	Raízes girassol (Helio 251)	HM061676	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
RG	Raízes girassol (Aguará 3)	HM061681	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
RI	Raízes girassol (Aguará 3)	HM061686	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>
RJ	Raízes girassol (Helio 251)	HM061692	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
RK	Raízes girassol (Helio 251)	HM061653	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
RM	Raízes girassol (Helio 251)	HM061659	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
RN	Raízes girassol (Helio 251)	HM061665	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
RO	Raízes girassol (Helio 251)	HM061671	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
RP	Raízes girassol (Aguará 3)	HM061677	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
T1AG	Capítulo girassol (Aguará 3)	HM061682	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>
T1AH	Capítulo girassol (Aguará 3)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
T2AF	Capítulo girassol (Aguará 3)	HM061690	<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
T2AJ	Capítulo girassol (Aguará 3)	HM061663	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
T2AL	Capítulo girassol (Aguará 3)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
T3AL	Capítulo girassol (Aguará 3)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.

Continua...

Continuação...

T4AE	Capítulo girassol (Helio 251)	HM061675	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
T4AL	Capítulo girassol (Helio 251)	HM061669	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
TSAA	Capítulo girassol (Helio 251)	HM061680	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. komagatae</i>
TSAB	Capítulo girassol (Helio 251)	HM061685	<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
TSAD	Capítulo girassol (Helio 251)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
ZA	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061648	<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
ZB	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061654	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
ZC	Rizosfera girassol (Helio 251)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
ZB'	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061660	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>
ZB''	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061666	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. komagatae</i>
ZD	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061672	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>
ZE	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061678	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>
ZF	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061683	<i>Bacillus</i>	<i>B. pumilus</i>
ZG	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061688	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
ZH	Rizosfera girassol (Helio 251)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
ZI	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061649	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
ZJ	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061655	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
ZK	Rizosfera girassol (Helio 251)	ND	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp.
ZM	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061687	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. komagatae</i>
ZR	Rizosfera girassol (Helio 251)	HM061661	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>

ND – não determinado devido à baixa qualidade das sequências obtidas; ^aNúmero de acesso às sequências no GenBank; ^bGênero dos isolados definido pelo coeficiente de similaridade do Ribosomal Database Project (RDP); ^cEspécie mais provável identificada pelo uso do algoritmo BLASTN.

Dos microrganismos encontrados em associações endofíticas com plantas as bactérias são as mais frequentes. Por exemplo, McInroy e Kloepper (1995) estudaram a diversidade de bactérias endofíticas em associação com raízes e caules de milho e algodão no estado do Alabama, EUA. Os autores obtiveram isolados de 36 gêneros, sendo que desses, 70,5% pertencentes a *Enterobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Agrobacterium*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*.

A rizosfera de diversas culturas foi descrita, mas são poucos trabalhos realizados sobre a rizosfera do girassol. Fages e Arsac (1991) isolaram 45 rizobactérias da rizosfera do girassol e observaram sua habilidade de promoção do crescimento das plantas aos 6 dias de germinação. Eles observaram que duas estirpes de *Azospirillum lipoferum* e uma *Xanthomonas maltophilia* produziram as melhores respostas duas semanas após a inoculação das bactérias observadas pelo aumento da parte aérea e na massa seca das raízes.

Entre as bactérias presentes nas raízes de girassol, Forchetti et al. 2007 encontraram *Bacillus* sp. e *Achromobacter* sp. Esses dados concordam com os obtidos do isolamento dos microrganismos associados as duas cultivares de girassol Helio 251 e Aguará 3, onde foram encontrados bactérias do gênero *Bacillus* e *Methylobacterium*.

Para propósitos práticos de uso de BPCVs na agricultura, as bactérias do gênero *Bacillus* apresentam certas vantagens, principalmente em relação à produção de inoculantes. Dentre as vantagens estão a resistência à dessecação, a formação de endósporo de resistência e a maior capacidade de sobrevivência quando formuladas com polímeros (MELO, 1998).

5.6 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

A formação de uma zona visível de maior crescimento bacteriano abaixo da superfície do meio semi-sólido sem N foi interpretada como resultado positivo para a capacidade de FBN. A avaliação final foi feita após repicagens sucessivas dos isolados em meio semi-sólido NFb, considerado o principal meio de cultivo para identificação de diazotróficos isolados de plantas não-leguminosas (Figura 5).

Figura 5- Isolados de girassol, T1AG, CH, CF, ZR-G, crescidas em meio NFb durante a terceira avaliação para observar película de crescimento.



Após as três repicagens sucessivas em meio NFb foi observado que os isolados CH (*B. cereus*) isolado do colmo e T1AG (*B. pumilus*) isolado do capítulo da variedade Aguará – 3 e ZR-G (*B. megaterium*) isolado da rizosfera do girassol da cultivar Hélio-251 apresentaram formação da película visível próxima a superfície do meio, demonstrando a capacidade em crescer em meio de cultura sob limitação na disponibilidade do nitrogênio. Esses dados indicam que os isolados apresentam a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico *in vitro*. Os demais isolados não apresentaram crescimento no meio NFb após a segunda ou terceira repicagem consecutiva. A bactéria *Azospirillum brasilense* ABV5 foi usada como controle positivo e apresentou crescimento no meio NFb no segundo dia de avaliação. Em razão de sua capacidade de sobreviver em ambientes deficientes em nitrogênio, as bactérias diazotróficas podem enriquecer seletivamente a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livre ou associados simbioticamente a plantas (DOBBELAERE et al., 2003).

Avanços significativos ocorreram nas pesquisas sobre FBN com a utilização do meio semi-sólido sem nitrogênio, como exemplo o meio NFb (Novo Fábio Pedrosa). A condição de semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhantemente ao que ocorre no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerófilas associadas a raízes. A formulação desse meio facilita o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* e, após essa descoberta, muitas outras espécies de bactérias diazotróficas foram

isoladas no Brasil, pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (OLIVEIRA et al., 2002; BALDANI; BALDANI, 2005).

Apesar de múltiplas espécies de *Bacillus* serem detectadas nos solos e na rizosfera (DING et al, 2005; NISHIJIMA et al., 2005), poucas pesquisas foram realizadas para indicar as espécies comumente isoladas. A capacidade de fixação de nitrogênio em espécies do gênero *Bacillus* foi demonstrada por Ding et al., (2005). Xie et al. (2003) isolaram espécies de *Bacillus* fixadoras de nitrogênio (*B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. azotoformans*) na rizosfera de arroz em campos na China. Esses dados concordam com os encontrados para os prováveis *B. cereus*, *B. megaterim* e *B. pumilus* isolados da rizosfera do girassol que apresentaram habilidade de FBN in vitro.

O conhecimento da capacidade de um organismo em realizar fixação biológica de nitrogênio (FBN) é importante para a seleção de estirpes com potencial de exploração biotecnológica. A habilidade de crescer no meio com limitação da disponibilidade de N é um indicativo da capacidade de FBN por bactérias, comprovado pelo crescimento em meio de cultura livre de N fixado.

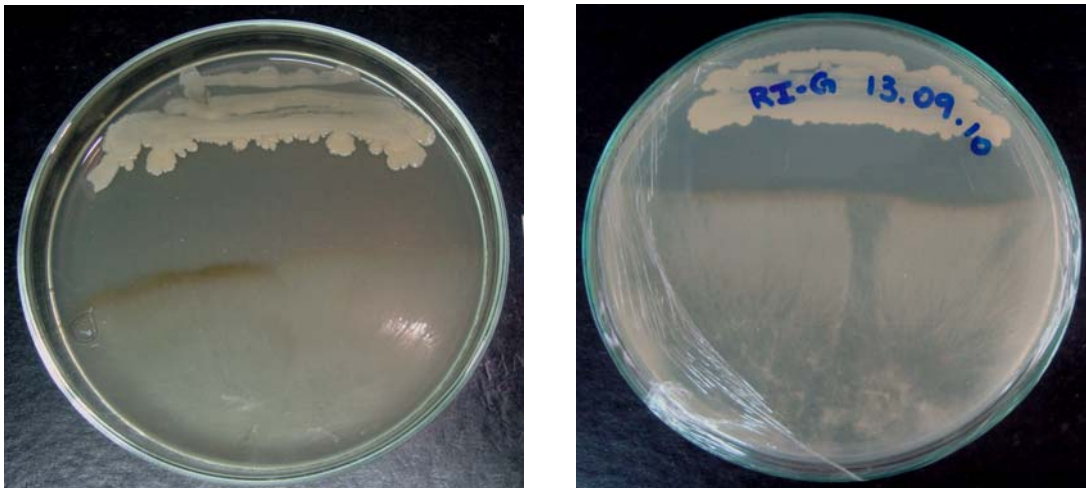
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DOS ISOLADOS CONTRA *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*, FITOPATÓGENO DO GIRASSOL

Os isolados foram crescidos em placas para observar a atividade antagonista contra o fungo *S. sclerotiorum*. Os dados em centímetros e a atribuição de notas estão exemplificados na tabela 5 e ilustrados na figura 6.

Tabela 5- Atividade antagonista dos isolados de girassol contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*. Atribuição de notas segundo a atividade antagonista.

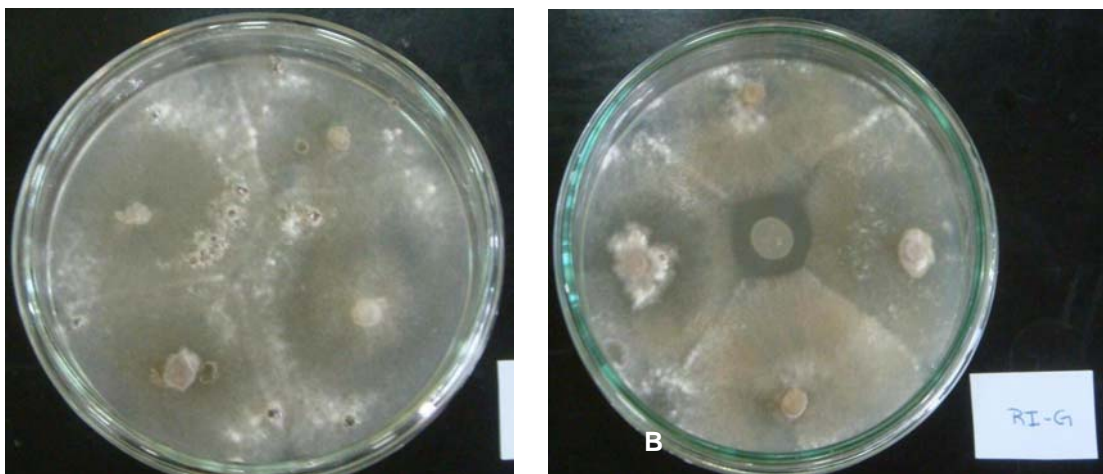
Isolado	Nota	Rep. I (cm)	Rep. II (cm)	Isolado	Nota	Rep. I (cm)	Rep. II (cm)
CA	4	<1	<1	RB	4	<1	<1
CB	4	<1	<1	RC	4	1	<1
CC-B	2	1	1,2	RD	5	neg.	neg.
CC-R	2	1,6	1,3	RE	4	<1	<1
CD	4	<1	<1	RF	5	<1	<1
CE	5	<1	<1	RG	4	<1	<1
CF	5	<1	<1	RI-A	5	<1	<1
CH	5	<1	<1	RI-G	2	1,5	1,6
CK	4	<1	<1	RK	3	<1	<1
CK'	4	<1	<1	RM	5	<1	<1
CK''	3	<1	<1	RN	5	<1	<1
CL	5	<1	<1	RO	5	<1	<1
CM	2	1	1,9	RP	4	<1	<1
CJ	4	<1	<1	R7	5	<1	<1
T1AH	4	<1	<1	ZA	3	<1	<1
T1AG	5	<1	<1	ZB'	5	<1	<1
T2AJ-I	4	<1	<1	ZC	5	<1	<1
T2AJ-II	5	neg.	neg.	ZD	4	<1	<1
T2AF	4	<1	<1	ZE	3	<1	<1
T3AL	2	1,5	1	ZG	3	neg.	neg.
T4AE	5	<1	<1	ZH	4	1	1,1
T4AL-I	4	1,5	1,4	ZK	5	<1	<1
T4AL-II	6	neg.	neg.	ZJ	4	<1	<1
TSAA	3	1	<1	ZL	5	<1	<1
TSAB	2	1,7	1,8	ZM	4	<1	<1
TSAD	4	1	<1	ZR-G	6	<1	<1
RA	5	1	<1	ZR-S	4	<1	<1

Figura 6- Atividade antagonista do isolado CC-R (A) e dos isolados RI-G (B) contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* em meio Dygs.



Os isolados de girassol CC-B (*B. cereus*), CC-R (*B. cereus*), CM (*Bacillus* sp.), T3AI (*Bacillus* sp.), T4AI-I (*B. cereus*), TSAB (*B. subtilis*) e RI-G (*B. pumilus*) isolados do colmo, capítulo e raiz, apresentaram atividade antagonista contra o fungo *S. sclerotiorum*, inibindo o crescimento do fitopatógeno na placa. Os dados obtidos foram comprovados através do segundo ensaio de atividade antagonista dos isolados contra o *S. sclerotiorum* (Figura 7).

Figura 7- (A) Controle positivo, fungo *S. sclerotiorum* em meio Dygs. (B) Atividade antagonista do isolado RI-G contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* em meio Dygs.



Nenhum dos isolados obtidos da rizosfera das plantas de girassol apresentou atividade antagonista contra o fungo. Os isolados CC-R, CC-B, CM,

TSAB, T3AL e RI-G apresentaram inibição contra o fungo entre 0,2 e 0,5 mm no segundo ensaio de atividade antagonista. O isolado T4AL-I não apresentou inibição contra o fungo.

Sclerotinia sclerotiorum é considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras causando infecções em mais de 400 espécies de plantas (DICKSON; PETZOLDT, 1996). No girassol, o fungo pode afetar a raiz e o colmo da planta, a haste ou o capítulo. No Estado do Paraná, em cultivos de girassol após a colheita da safra de verão, a incidência da doença na haste e no capítulo foi alta (17,6% a 100,0%), nas regiões de clima frio no inverno nos anos de 1996 a 1998 (CAMPOS-LEITE, 2005).

As pesquisas sobre controle biológico de *S. Sclerotiorum* continuam focadas principalmente no controle da produção de apotécios e em hiperparasitismo por antagonistas do fungo para reduzir a carga de escleródios no solo (HUANG, et al., 1997; McLAREN et al., 1996; HUANG; ERICKSON, 2000). No girassol, o controle químico da doença não tem sido recomendado por vários aspectos: não existem produtos com eficiência sistêmica, há dificuldade de proteger todo o período da suscetibilidade do capítulo à infecção (floração), além de não haver produtos registrados junto ao DDIV/MAPA, para uso na cultura no Brasil (CAMPOS-LEITE, 2005).

Endofíticos exercendo atividade inibitória *in vitro* contra fitopatógenos têm sido estudados e relatados. Shimizu et al. (2000) estudaram a produção de substâncias antimicrobianas por um actinomiceto endofítico e sua atividade antifúngica. Segundo os autores, houve produção de metabólitos em meio de cultura com amplo espectro antimicrobiano, inibindo o crescimento de *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia homoeocarpa*.

Savchuk e Fernando (2004) avaliaram *Pseudomonas spp.* antagonistas (DF-41 e PA-23) quanto à inibição de germinação de ascósporos e seu efeito no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causador da podridão de canola, utilizando a técnica de inoculação de pétalas. Os resultados dos estudos indicaram que PA-23 e FD-41 podem ser agentes de controle biológico

eficientes contra *S. sclerotiorum* de canola e têm implicações práticas para o controle biológico desta doença pelas bactérias no campo.

Os isolados de bacilos obtidos das plantas de girassol das cultivares Helio 251 e Aguará 3, apresentaram atividade antagonista contra o fungo patogênico *S. Sclerotiorum*, esses dados estão de acordo com os apresentados por Araújo et al. (2005) que isolaram bactérias do gênero *Bacillus* com o objetivo de avaliar o seu potencial de controle biológico de patógenos de sementes de soja. As estripes PRBS-1 e AP-3, inibiram cinco fungos patogênicos de sementes de soja in vitro, entre eles *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum truncatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Phomopsis sp.*

Os isolados que apresentaram potencial para serem utilizados no controle biológico do fungo *S. Sclerotiorum* devem ser estudados para detectar as substâncias produzidas pelas bactérias no meio de cultura que inibiu o crescimento do fungo, bem como testes para comprovar a atividade antagonista desses isolados em plantas de girassol infectadas com o *S. Sclerotiorum*.

5.8 PRODUÇÃO DE QUITINASE E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINÁSICA

Foi realizado um ensaio em cultivo líquido para determinar a atividade enzimática do extrato bruto enzimático dos isolados crescidos em meio contendo quitina em pó para indução da produção da enzima quitinase. Nenhum dos isolados apresentou potencial para produção da enzima, não sendo observada atividade enzimática no extrato livre de células obtido a partir do cultivo de todos os isolados.

A quitina é um polímero de *N*-acetilglicosamina com ligações β -1,4, encontrada em carapaças de insetos, parede celular de fungos e crustáceos. É o segundo biopolímero mais abundante depois da celulose, e está geralmente ligada a outros polissacarídeos e proteínas (MAJETI; KUMAR, 2000). Na maioria dos fungos a quitina é o maior componente estrutural da parede celular, sendo, portanto, susceptível a inúmeras espécies de bactérias, actinomicetos e fungos que podem

agir como antagonistas devido à produção de enzimas quitinolíticas (SAHAI ; MANOCHA, 1993).

As bactérias têm sido postuladas para produzir quitinases para a digestão da quitina e utilização de seus fragmentos principalmente como fontes de carbono e energia (COHEN-KUPIEC; CHET, 1998). Mabuchi et al. (2000), relataram que a estirpe de *Bacillus cereus* CH produz, no sobrenadante da cultura, quatro quitinases diferentes.

Itano (2006) selecionou 3 cepas de bacilos (DP, CA10 e CA12) produtoras de quitinase através da otimização da produção em meio de cultura pela metodologia de superfície de resposta. Wiwat et al. (1999) produziram quitinase a partir de *Bacillus circulans* 41 para uso como suplemento de bioinseticida de *B. thuringiensis* para controle de larvas de lepidópteros.

As enzimas quitinolíticas apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas no ramo da indústria e agricultura. As quitinases podem ser utilizadas no controle de fungos patógenos de plantas e insetos. Há também, um crescente interesse na produção de quitino-oligossacarídeos biologicamente ativos através da utilização das quitinases. Essas enzimas podem ainda ser aplicadas na produção de fonte de proteína unicelular, preparação de enzimas micolíticas e na formação de protoplastos fúngicos (PATIL et al., 2000).

5.9 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS

Neste estudo doze isolados obtidos a partir de amostras de rizosfera, raízes, colmo e capítulo, sendo 09 obtidos da variedade Helio 251 e 03 obtidos do Aguará 3 (Tabela 6), apresentaram potencial para solubilização de fosfato. Foi estimado o IE (Índice Enzimático) a partir da avaliação do diâmetro da colônia e do halo de solubilização apresentado. Desta forma, os isolados foram classificados como baixa capacidade de solubilização de fosfatos (IE entre 1 e 1,5 mm), média capacidade de solubilização de fosfatos (IE entre 2 e 2,7 mm) e elevada capacidade de solubilização de fosfatos (IE acima de 3 mm).

Tabela 6- Potencial de solubilização de fosfato por isolados bacterianos associados a diferentes tecidos de duas variedades de girassol.

Isolado	Origem quanto ao isolamento (cultivar)	Colônia – diâmetro (mm)	Halo – diâmetro (mm)	IE
CF	Colmo girassol (Aguará 3)	3,2	10,4	3,278
CL	Colmo girassol (Helio 251)	3,7	5,8	1,567
CM	Colmo girassol (Helio 251)	5,1	15,1	2,966
RC	Raízes girassol (Aguará 3)	2,1	5,7	2,724
RK	Raízes girassol (Helio 251)	6,1	8,3	1,364
RM	Raízes girassol (Helio 251)	13,0	19,1	1,468
RN	Raízes girassol (Helio 251)	13,5	16,5	1,25
T3AL	Capítulo girassol (Aguará 3)	3,7	5,8	1,567
TSAB	Capítulo girassol (Helio 251)	2,6	6,4	1,5
TSAD	Capítulo girassol (Helio 251)	5,1	15,1	2,966
ZA	Rizosfera girassol (Helio 251)	2,5	9,8	3,882
ZJ	Rizosfera girassol (Helio 251)	3,7	9,3	2,504

Os isolados CF, CM, ZA e TSAD, apresentaram elevado potencial para solubilização de fosfato, pois apresentaram um IE superior a 3 mm de solubilização do P insolúvel (CaHPO_4) no meio de cultura. Estes resultados são relevantes, pois, vários relatos sugerem que BPCV estimulam o crescimento das plantas facilitando a captação de nutrientes como N, P e K (NO_3^+ , H_2PO_4^- e K^+), e microelementos pela planta (DOBBELAERE et al., 2003).

Outras avaliações podem ser realizadas para comprovar a solubilização de fosfato orgânico e inorgânico em meio de cultura líquido. Não foi observado potencial de solubilização de P para nenhum dos isolados obtidos da rizosfera da variedade Aguará-3.

Frequentemente, a solubilização de P tem sido postulada como um possível mecanismo de promoção de crescimento da planta por BPCV (RICHARDSON, 2001). A solubilização de P é importante para o crescimento das

plantas, pois o P é um elemento essencial, é no mesmo tempo um dos íons menos solúveis de nutrientes no meio ambiente, geralmente menos de 5% do total de fosfato do solo é disponível para as plantas (BROWN, 1994).

A adição de fertilizantes fosfatados tem se tornado uma prática comum na agricultura moderna (DOBBELAERE et al., 2003). No entanto, uma grande porção do fosfato inorgânico solúvel aplicado no solo como fertilizante é rapidamente imobilizado pelo ferro, alumínio e cálcio, assim tornando-se inviáveis as plantas (HOLFORD, 1997).

Os microrganismos do solo são capazes de solubilizar o fosfato mineral insolúvel pela produção de vários ácidos orgânicos (JONES, 1998). Isso resulta na acidificação do solo ao redor, liberando íons ortofosfato solúveis ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ e HPO_4^{-2}) que podem ser facilmente absorvido pelas plantas. Um grande número de bactérias solubilizadoras de P tem sido isoladas da rizosfera de diversas culturas (DOBBELAERE et al., 2003).

Estima-se que microrganismos solubilizadores de P podem constituir 20 a 40 % da população de microrganismos cultiváveis do solo, e que uma proporção significativa pode ser isoladas da rizosfera (CHABOT et al., 1993). Contudo neste estudo, a maioria dos isolados solubilizadores de fosfato não foram isolados da região rizosférica das plantas de girassol.

Vários bacilos solubilizadores de fosfato ocorrem em solos (SKRARY; CAMERON, 1998). Alguns autores relatam o uso de *Bacillus megaterium* e *P. Fluorescens* como inoculantes para aumentar a disponibilidade de fosfatos orgânicos via ação de fosfatases ou através da solubilização de fosfatos inorgânicos via ácidos orgânicos (DUFF, et al., 1963; MARTIN, 1973). Gaing e Gaur (1991) relataram que uma linhagem de *B. subtilis* aumentou a biomassa, produção de grãos e absorção de P e N de feijão desenvolvido em solo de campo deficiente em P.

Beneduzi et al. (2008) encontraram 22 bacilos na rizosfera de arroz que apresentaram solubilização de fosfato em meio de cultura. Ekin (2010) inoculou a estirpe de *Bacillus* M-13 solubilizadora de fosfato em girassol sem e com diferentes quantidades de fósforo (P). A estirpe de *Bacillus* M-13 foi capaz de

mobilizar P e foi observado uma melhora na qualidade e rendimento de óleo nas sementes do girassol.

5.10 PRODUÇÃO DE AUXINAS E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A produção de compostos indólicos foi observada em 52 dos 57 isolados, com taxas variando entre 93 a 1,653 μM de AIA por μg de proteína (Tabela 7). A maior produção de AIA foi apresentada pelo isolado RP, filogeneticamente relacionado à *B. cereus*.

Tabela 7- Produção de auxinas e proteínas dos isolados de girassol

Isolado	Espécie mais provável	mM AIA	$\mu\text{g/mL}$ de proteína	Auxina/Proteínas $\mu\text{M/mg}$
ZA	<i>B. amyloliquefaciens</i>	23,26	60,95	381,62
ZB'	<i>B. megaterium</i>	26,23	53,77	487,81
ZC	<i>Bacillus</i> sp.	23,95	37,34	641,40
ZD	<i>B. subtilis</i>	28,73	47,09	610,10
ZE	<i>B. pumilus</i>	17,34	80,98	214,12
ZG	<i>B. thuringiensis</i>	9,14	82,52	110,76
ZH	<i>Bacillus</i> sp.	24,86	93,81	265,00
ZJ	<i>B. thuringiensis</i>	9,14	97,92	93,34
ZK	<i>Bacillus</i> sp.	9,36	71,74	130,47
ZM	<i>M. komagatae</i>	59,72	47,60	1254,62
ZR-S	<i>B. megaterium</i>	27,37	97,92	279,51
ZR-G	<i>B. megaterium</i>	12,78	35,28	362,24
RA	<i>B. megaterium</i>	94,36	98,95	953,61
RB	<i>B. thuringiensis</i>	9,14	90,73	100,73
RC	<i>B. megaterium</i>	28,28	97,92	288,80
RD	<i>B. megaterium</i>	8,68	85,09	102,00
RE	<i>B. megaterium</i>	12,78	79,44	160,87
RF	<i>B. thuringiensis</i>	8,45	75,84	111,41
				Continua...
Continuação...				
RG	<i>B. megaterium</i>	9,36	66,09	141,63

RI-G	<i>Bacillus</i> sp.	24,18	50,69	477,02
RK	<i>B. cereus</i>	8,68	79,44	109,26
RM	<i>B. megaterium</i>	8,91	72,76	122,46
RN	<i>B. cereus</i>	9,82	85,09	115,41
RO	<i>B. megaterium</i>	9,14	64,55	141,60
RP	<i>B. cereus</i>	45,60	27,58	1653,37
CA	<i>B. cereus</i>	62,69	63,52	986,93
CB	<i>B. amyloliquefaciens</i>	59,72	60,95	979,82
CC-A	<i>B. cereus</i>	13,92	65,57	212,29
CC-B	<i>B. cereus</i>	75,90	66,09	1148,43
CD	<i>B. cereus</i>	49,24	56,33	874,13
CE	<i>B. thuringiensis</i>	14,15	47,60	297,27
CF	<i>B. cereus</i>	12,56	40,42	310,74
CH	<i>B. cereus</i>	13,47	50,69	265,73
CJ	<i>B. subtilis</i>	33,29	79,95	416,39
CK	<i>B. cereus</i>	9,82	83,55	117,53
CK'	ND	43,77	53,25	821,97
CK"	<i>B. megaterium</i>	25,77	69,68	369,83
CL	<i>B. cereus</i>	12,10	37,85	319,68
CM	<i>Bacillus</i> sp.	57,90	35,28	1641,16
T1AH	<i>Bacillus</i> sp.	15,75	32,71	481,50
T1AG	<i>B. pumilus</i>	8,45	48,63	173,76
T2AF	<i>B. amyloliquefaciens</i>	19,16	100,49	190,67
T2AJ-I	<i>B. cereus</i>	9,59	26,04	368,28
T2AJ-II	<i>B. cereus</i>	10,50	48,12	218,20
T3AL	<i>Bacillus</i> sp.	10,96	66,09	165,83
T4AE	<i>B. thuringiensis</i>	11,19	82,00	136,46
T4AL-I	<i>B. thuringiensis</i>	11,42	45,55	250,71
T4AL-II	<i>B. thuringiensis</i>	17,11	52,23	327,59
TSAA	<i>M. komagatae</i>	40,36	53,77	750,60
TSAB	<i>B. amyloliquefaciens</i>	12,56	97,41	128,94
TSAD	<i>Bacillus</i> sp.	11,42	25,53	447,32

Os isolados ZM, RA, RP, CA, CB, CC-B, CD e CM isolados da rizosfera, raiz e colmo do girassol apresentaram altas produções do fitormônio “*in vitro*”, apresentando-se como potenciais promotores do crescimento vegetal.

Os isolados apresentaram produção de proteínas variando entre 25,53 e 111,27 µg/mL, sendo os isolados ZE, ZG, ZH, ZJ, ZR-S, RA, RB, RC, RI-A, RN. CK, T2AF, T4AE e TSAB os que apresentaram valores superiores a 80 µg/mL de proteínas após dois dias de crescimento.

A capacidade de sintetizar ácido-3-indol acético (AIA) é generalizada entre as bactérias do solo e associadas a plantas. Estima-se que 80 % das bactérias isoladas da rizosfera possam produzir AIA (PATTEN; GLICK, 1996). As respostas da planta ao AIA externo, (liberado por microrganismos) pode variar de efeitos benéficos ou deletérios, dependendo da concentração na raiz das plantas (LAMBRECHT et al., 2000).

A produção de AIA foi detectada em bactérias com hábitos de endofíticas e simbióticas como *Frankia* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (MUSSON, 1995). Este hormônio vegetal do grupo das auxinas estimula tanto a alongação celular quanto a divisão e diferenciação celular nas plantas o que proporciona facilidade na retirada de água e nutrientes do solo para a planta (VERMA et al., 2001; DOBBELAERE et al., 2003).

As bactérias produzem AIA por várias vias de síntese. O aminoácido triptofano é um precursor de AIA, pois sua adição em meios de cultura promove aumento da síntese, mas há vias independentes de triptofano, Esta transformação pode ser realizada por microrganismos que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres (ZAKHAROVA et al., 1999; KUSS, et al., 2007). A produção de AIA por PGPR pode variar entre diferentes espécies e subespécies, e que também é influenciada pela condição de cultivo, estágio de crescimento e disponibilidade de substrato (MIRZA et al., 2001).

A produção de concentrações de AIA não muito elevadas é preferível, pois este fitormônio em concentrações muito elevadas pode ter efeito negativo sobre o crescimento, e até atuar como um herbicida, como ocorre pela aplicação de 2,4,diclorofenilacético (2,4-D) uma auxina sintética (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Zakharova et al. (1999) observaram a síntese de ácido-3-indol acético em *Azospirillum brasilense* durante a incubação das culturas após 8, 24, 48 e 72 horas após a adição do triptofano. A quantidade de AIA formado foi 0.3, 1.3, 12 e 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os autores acreditam que a maior quantidade de auxina produzida por *Azospirillum brasilense* seja pelo catabolismo do aminoácido triptofano.

Bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Acetobacter*, *Azotobacter* e *Bacillus* produzem AIA e são efetivamente usados por aumentar o crescimento e a produtividade das plantas cultivadas (PATTEN; GLICK 1996; IDRIS et al. 2007). Araújo et al. (2010), observou que a produção de AIA por estirpes de *Bacillus* “*in vitro*”, variou entre 0,75 a 21, 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Beneduzi et al. (2008) observaram a produção de AIA entre 0,1 e 30 mg.mL^{-1} *in vitro* após 72 e 144 horas de incubação por isolados de bacilos.

Em conjunto, os resultados indicaram que as bactérias isoladas do girassol podem ser promissoras na promoção de crescimento vegetal. Para observar este efeito, testes de inoculação em plantas deverão ser realizados.

5.11 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

Dos 57 isolados, 32 foram capazes de produzir sideróforos (Figura 8), sendo que nove apresentaram elevada capacidade de produção de sideróforos. A rizosfera e o capítulo do girassol apresentaram maiores números de isolados produtores de sideróforos. Foi estimado o índice de produção de sideróforos a partir da avaliação do diâmetro da colônia e do halo de produção apresentado.

Visando encontrar isolados com alto potencial de solubilização de fosfato, os isolados foram classificados como baixa capacidade de produção de sideróforos (entre 1 e 1,9 mm), média capacidade de produção de sideróforos (entre 2 e 2,9 mm) e elevada capacidade de produção de sideróforos (acima de 3 mm) (Tabela 8). Dentre os 32 isolados, 9 apresentaram elevada capacidade de produção de sideróforos apresentando halos de produção acima de 3 mm.

Os microrganismos competem por nutrientes e elementos essenciais no solo e na rizosfera (MELO, 1998). Kloepper et al. (1980) foram os primeiros a

demonstrar a importância da competição por ferro, devido à produção de sideróforos por microrganismos.

Sideróforos são substâncias de baixo peso molecular produzidas pela maioria de bactérias e fungos em condições limitantes de ferro, com grande afinidade por íons de Fe^{+3} e que diferem de acordo com seus grupos funcionais (WINKELMANN, 1991; VASSILEV et al., 2006). O complexo Fe-sideróforo pode ser específico para o organismo que o produziu. A produção de sideróforos ajuda um microrganismo a competir eficazmente com outros organismos pelo ferro disponível, desta forma, pode ser restringido o crescimento de fungos e bactérias, havendo controle das populações microbianas pelo organismo produtor (ZAGO et al., 2000; VASSILEV et al., 2006).

Figura 8- Produção de sideróforos em meio Dygs suplementado com CromoAzurool S. **(A)** Isolados do capítulo T4AE e T2AJ-II. **(B)** Isolados da raiz RI-A e do capítulo T4AL-I.

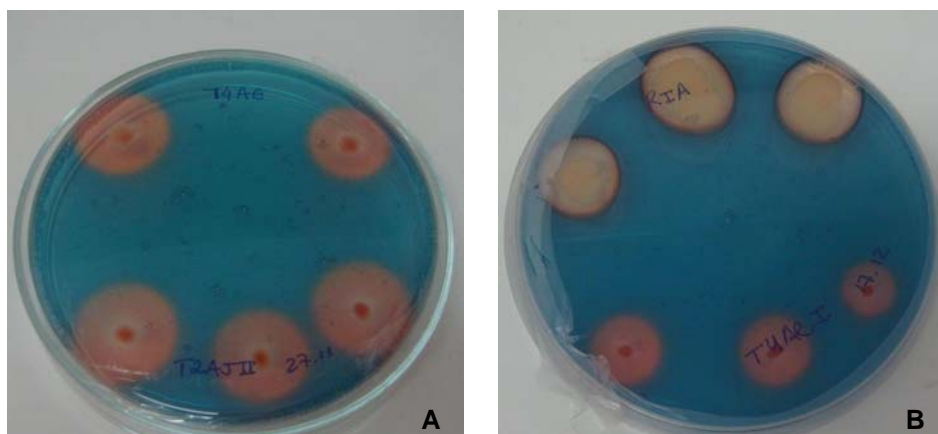


Tabela 8- Potencial de produção de sideróforos por isolados bacterianos associados a diferentes tecidos de duas variedades de girassol. Média de 3 repetições.

Isolado	Espécie mais provável	Colônia – diâmetro (mm)	Halo – diâmetro (mm)	Índice de produção de sideróforo
CB	<i>B. amyloliquefaciens</i>	8,33	22,3	2,67
CC-B	<i>B. cereus</i>	7,66	19	2,48
CF	<i>B. cereus</i>	9,33	17,3	1,85
CJ	<i>B. subtilis</i>	8,66	19,33	2,23
CL	<i>B. cereus</i>	4,33	9,66	2,23
CM	<i>Bacillus</i> sp.	8	11	1,37
RC	<i>B. megaterium</i>	11,3	17,3	1,53
RD	<i>B. megaterium</i>	13,60	19,33	1,42
RE	<i>B. megaterium</i>	8	16,66	2,08
RF	<i>B. thuringiensis</i>	2,00	10,5	5,25
RI-A	<i>B. pumilus</i>	9,66	17	1,76
RM	<i>B. megaterium</i>	3,00	8,33	2,78
RN	<i>B. cereus</i>	13	23	1,77
RO	<i>B. megaterium</i>	2,00	9,33	4,67
T1AG	<i>B. pumilus</i>	2,33	6	2,58
T1AH	<i>Bacillus</i> sp.	2	7,66	3,83
T2AF	<i>B. amyloliquefaciens</i>	4,33	16	3,70
T2AJ-II	<i>B. cereus</i>	2	7,33	3,67
T3AL	<i>Bacillus</i> sp.	7,66	16,33	2,13
T4AE	<i>B. thuringiensis</i>	6,33	17,66	2,79
T4AL-I	<i>B. thuringiensis</i>	4,00	12,33	3,08
TSAA	<i>M. komagatae</i>	10	19	1,90
TSAD	<i>Bacillus</i> sp.	8,66	10,33	1,19
ZA	<i>B. amyloliquefaciens</i>	20,30	23,33	1,15
ZB'	<i>B. megaterium</i>	10,66	17,33	1,63
ZC	<i>Bacillus</i> sp.	12,33	18,33	1,49
ZG	<i>B. thuringiensis</i>	4	14	3,50
ZK	<i>Bacillus</i> sp.	2,00	10,33	5,17
ZJ	<i>B. thuringiensis</i>	6,66	15,66	2,35
ZL	ND	4,00	11,5	2,88
ZR-G	<i>B. megaterium</i>	3,33	11,33	3,40
ZR-S	<i>B. megaterium</i>	10,33	23,33	2,26

Não foi observado produção de sideróforos por nenhum isolado da rizosfera do girassol da variedade Aguará – 3.

Pereira et al. (2010) relataram a produção de sideróforos em meio de cultura contendo cromoazurol S por estirpes de *Bacillus cereus*, *B. thermocloaceae*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, e *B. silvestris* isoladas de áreas impactadas por rejeitos da mineração de carvão. Beneduzi et al. (2008) isolaram 32 bacilos produtores de sideróforos da rizosfera de arroz.

Os isolados de girassol *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. pumilus* produziram sideróforos em meio de cultura contendo cromoazurol S.

6. CONCLUSÕES

Através das técnicas utilizadas foi possível identificar entre os 57 isolados bacterianos obtidos da raiz, rizosfera, capítulo e colmo das cultivares de girassol Helio 251 e Aguará 3, 18 isolados com características de microrganismos promotores do crescimento vegetal.

Não foi observada atividade da enzima quitinase do extrato livre de células das culturas dos isolados das duas variedades de girassol.

Através das técnicas moleculares foi possível caracterizar a diversidade e identificar os microrganismos da rizosfera ou aqueles associados a plantas de girassol. Através dos marcadores RAPD foi possível identificar isolados com perfis eletroforéticos idênticos e também observar o agrupamento dos isolados em grupos obtidos das mesmas partes da planta com alta similaridade.

O seqüenciamento do gene 16S rRNA permitiu classificar a grande maioria dos isolados como pertencente ao gênero *Bacillus*, compreendendo as espécies *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* e *Bacillus* sp. Somente 3 isolados obtidos foram classificados fora do gênero *Bacillus*, sendo identificadas como *Methylobacterium* sp.

Os isolados CC-B (*B. cereus*), CM (*Bacillus* sp.), ZR-G (*B. megaterium*) e T1AG (*B. pumilus*) apresentaram mais de duas características de promoção do crescimento, entre elas FBN, atividade antagonista, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e produção de auxinas.

REFERÊNCIAS

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. **Biotechnol. J.**, v. 1, p. 1112–1123, 2006.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 520p, 2005.

AKOPIANZ, N., BUKANOV, N.O., WESTBLOM, T.U., KRESOVICH, S., BERG, D.E., 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 20, 5137–5142.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, vol. 25, no. 17, 1997.

ANTOLÍN, G., TINAUT, F.V., Briceño, Y., Castaño, V., PÉREZ, C., RAMÍREZ, A.I. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 111–114, 2002.

ARAÚJO, W. L.; MACCHRONI, W.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. V. A.; SARIDAKIS, H. O. ; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rotstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development, **World Journal of Microbiology ; Biotechnology**, v. 21:1639–1645, 2005.

ARAÚJO, F. F.; GUEREIRO, R. T. Bioprospection of *Bacillus* isolates promoters of corn growth in natural and sterile soil. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 34, n. 4, p. 837-844, jul./ago, 2010.

ASHRAFUZZAMAN, M.; HOSSEN, F. A.; ISMAIL, M. R.; HOQUE, MD. A.; ISLAM, M. I.; SHAHIDULLAH, S. M.; MEON, S. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8 (7), pp. 1247-1252, 6 April, 2009.

ATKINSON, D. C.; WATSON, A. The beneficial rhizosphere: A dynamic entity. **Appl. Soil Ecol**, v. 15, p. 99-104, 2000.

AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R. E., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. and STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. Greene Publishing ; Wiley Interscience, New York, 1987.

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.

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.

BARDAKCI, F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. **Turk J Biol.** v. 25, p. 185-196, 2001.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAN, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology** v. 39, 311 – 320, 2008.

BERGLUND, D. R. Sunflower Production. NDSU Extension Service. N. D. **Agricultural Experiment Station** – North Dakota State University, p. 1-117, 2007.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B.; YANNI, Y. G.; ROLFE, B.G. Rhizobial Inoculation Influences Seedling Vigor and Yield of Rice. **Agron. J.**, v. 92, p. 880–886, 2000.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Fertilizers Research**, v. 42, p. 241-250, 1995.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem** v. 72, p. 248-54, 1976.

BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Annu. Rev. Phytopathol.** 12: 181–197, 1994.

BULL, A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M.; Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Sept. p. 573–606, 2000.

CAMPOS LEITE, R. M. V. B. de. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja.** Comunicado Técnico 76 - ISSN 1517-1752, Londrina, PR - Março, 2005.

CAMPOS-LEITE, R. M. V. B.; CASTRO, C. de; BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, F. A. de; CARVALHO, C. G. P. de; OLIVEIRA, A. C. B. de.; **Indicações para o cultivo de girassol nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Roraima.** Comunicado Técnico 78, EMBRAPA-Soja, Londrina, PR, ISSN 1517-1752, Fevereiro, 2007.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. **Trans. ASAE.**, v. 44, p. 1429-1436, 2001.

CANBOLAT, M. Y.; BILEN, S.; ÇAKMAKÇL, R.; SAHIN, F.; AYDIN, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biol Fertil Soils** 42: 350–357, 2006.

CARPENTIEIR-PÍPOLO, C.; GARCIA, J. E.; RINALDI, D. A. Desenvolvimento e aplicações de marcadores moleculares. In: **Biotecnologia na Agricultura: aplicações e biossegurança.** COODETEC- Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, p. 1-29, 2006.

CASTRO, C. de; OLIVEIRA, F. A. de; Nutrição e adubação do Girassol. In: **Girassol no Brasil**, cap. 13, pg. 317-365, 2005.

CASTRO, C. de; FARIAS, J. R. B. Ecofisiologia da Girassol. In: **Girassol no Brasil**, cap. 9, pg. 163-218, 2005.

CHABOT, R., ANTOUN, H., CESCAS, M. P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Can. J. Microbiol.** 39: 941–947, 1993.

CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. **Carbohydrate Analysis**, 2th edn. New York: Oxford University Press, 1994.

COHEN-KUPIEC, R., AND CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 9, p. 270–277, 1998.

CONAB – Companhia Nacional de Desenvolvimento – **Acompanhamento da Safra Brasileira. Grãos – Safra 2009/2010**, Décimo Levantamento Julho/2010. Brasília: Conab, 2010.

CORRÊA, I. M., MAZIERO, J. V. G., ÚNGARO, M. R., BERNARDI, J. A., STORINO, M. Desempenho de motor diesel com misturas de biodiesel de óleo de girassol. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 923-928, maio/jun., 2008

COSTA, A. R. da; MADARI, B. E.; CARVALHO, M. T. M.; MACHADO, P. L. O. de A.; BERNARDES, T. G.; SILVEIRA, P. M. da; **Uso do Nitrogênio na Agricultura e suas Implicações na Emissão do Gás de Efeito Estufa Óxido Nitroso (N₂O)**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão, Documentos 249, ISSN 1678-9644 Dezembro, 2009

DALL'AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C.; Origem e histórico do Girassol. In: **Girassol no Brasil**, cap. 1, pg. 1-12, 2005.

DERAKSHANI M, LUKOW T, LIESACK W: Novel bacterial lineages at the (sub) division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. **Appl Environ Microbiol.**, 67:623-631, 2001.

DIAS, V. P.; FERNANDES, E. Fertilizantes: uma visão global sintética. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 24, p. 97-138, 2006.

DICKSON, H.; PETZOLDT, R. Breeding for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica oleracea*. **Acta Hort.** 407, 103–108, 1996.

DING, Y., WANG, J., LIU, Y., CHEN, S., Isolation and identification of nitrogen fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **J. Appl. Microbiol.** 99, 1271–1281, 2005.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.

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

DUFF, R. B.; WEBLEY, D. M.; SCOTT, R. O. Solubilization of minerals and related materials by 2-ketogluconic acid producing bacteria. **Soil Science**, v. 95, p. 105-114, 1963.

EKIN, Z. Performance of phosphate solubilizing bacteria for improving growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in the presence of phosphorus fertilizer. **African Journal of Biotechnology** Vol. 9(25), pp. 3794-3800, 21 June, 2010.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol. **Energy ; Fuels**, 16, 443-450, 2002.

FAGES, J.; ARSAC, J. F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, 137, p. 87-90, 1991.

FAORO, H. **Determinação da Biodiversidade de *Archaea* e *Bacteria* da Mata Atlântica Paranaense**. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências-Bioquímica) Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2006.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Quim.Nova**, Vol. 32, No. 1, 106-111, 2009.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 5, 871-879, 2005.

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

GAING, S. ; A C. GAUR. 1991. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. **Plant and Soil**, 133: 141-149.

GARCIA de SALAMONE, I. E.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. **Can. J. Microbiol.** 47, p. 404–411, 2001.

GIOVANNONI, S. J.; BRITSCHGI, T. B.; MOYER, C.; FIELD, K. G. (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature** (London) 345, p. 60-62.

GLICK B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can. J. Microbiol.** 41, p. 109-117, 1995.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIN, G.; PENROSE, D. M. **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria**. Imperial College Press - London. p. 1-249, 1999.

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

HAICHAR, F.Z., MAROL, C., BERGE, O., RANGEL-CASTRO, J.I., PROSSER, J.I., BALESSENT, J., HEULIN, T., ACHOUAK, W., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, v. 2, pp. 1221-1230.

HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, 95-98.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEY, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANADA, R., ROMEIRO, R.; Seleção preliminar de rizobactérias como promotoras de crescimento e como indutoras de resistência sistêmica a *Xanthomonas campestris* em girassol. International Seed Testing Association. (1995) 24th Congress of Copenhagen. Published by ISTA, Zurich, CH-Switzerland. **Fitopatologia Brasileira** 23:209 (Abstract) 1998.

HANKIN, L. ; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, 67:597-607, 1975.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microb. Ecol.** v. 35, p. 1–21, 1998.

HOLFORD, I.C.R. Soil phosphorus, its measurements and its uptake by plants. **Austr. J. Soil Res.** 35: 227–239, 1997.

HOLLIS, J. P. Bacteria in healthy potato tissue. **Phytopathology**, Madison, v. 41, p. 350-367, 1951.

HUANG, H., HUANG, J., SAIDON, G.; ERICKSON, R. Effect of allyl alcohol and fermented agricultural wastes on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and colonization by *Trichoderma spp.* **Can. J. Plant. Pathol.** 19, 43–46, 1997.

HUANG, H. and ERICKSON, R. Biocontrol of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* in pulse and oilseed crops. **Annu. Rep. Bean Improv. Coop.** 43, 90–91, 2000.

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

HYNES, R. K., LEUNG, G.C.Y., HIRKALA, D. L.M. AND NELSON, NELSON, L. M. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, 54. 4, p.248 (11), 2008.

IAPAR – **Programa de pesquisa em Culturas diversas** – Girassol, Disponível em: www.iapar.br. Acesso em: Maio-2009.

IAPAR – Participação do IAPAR no Programa Paranaense de Bioenergia, www.iapar.br, Julho-2005.

IBGE - Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO, **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola** - Janeiro 2010.

IDRIS, E. E.; IGLESIAS, E. J.; TALON, M.; BORRIS, R. Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Mol Plant-Microb Interact** 20:619–626, 2007.

ITANO, F. H. **Otimização da produção de quitinase de *Bacillus* spp.** Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 2006

JONES, D.L. Organic acids in the rhizosphere — a critical review. **Plant Soil** 205: 25–44, 1998.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology** 2004, 96, 473–480

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity, **Journal of Microbiological Methods** 58, p. 169– 188, 2004.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.286, p.885-886, 1980.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: **Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and environmental Management**. New York: Ed. FBJ meeting, p. 255-274, 1993.

KLOEPPER, J. W., RYU, C. M., AND ZHANG, S. A. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology** 94, p.1259-1266, 2004.

KUMAR, V., AGGARWAL, N. KUMAR, SINGH B.P. Influence of Analogue-Resistant Mutants of *Azotobacter chroococcum* Solubilizing Phosphate on Yield and Quality of Sunflower (*Helianthus annuus*). **Folia Microbiol.** 45 (4), p.349-352, 2000.

KUSS, A. V., KUSS, V. V., LOVATO, T., FLÔRES, M. F. **Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas.** Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, out. 2007.

LAGREID, M.; BOCKMAN, O. C.; KAARSTAD, O. **Agriculture fertilizers and the environment**. Wallingford: CABI Publishing, 1999. 294 p.

LAKSHMINARAYANA K.; Influence of *Azotobacter* on nitrogen nutrition of plants and crop productivity. **Proc.Indian Nat.Sci.AcadB** 59, p. 303-308, 1993.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant Interactions. **Trends in Microbiology** 298 vol. 8 no. 7 July 2000

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics Applications Note**, Vol. 23 no. 21, pages 2947–2948.

LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C.; Girassol no Brasil, Embrapa soja: Londrina, In: **Girassol no Brasil**, 2005, cap.1.

LIESACK, W.; JANSSEN, H. P.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *In: Modern Soil Microbiology*. VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. Marcel Dekker, Inc. New York, 712p, 1997.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 86: p. 1–25, 2004.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W. ; de BRUIJIN, F. J. The three Ds of PCR based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology** 37, p. 81-125, 1999.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-173, 1994.

MABUCHI, N., HASHIZUME, I., AND ARAKI, Y. 2000. Characterization of chitinases excreted by *Bacillus cereus* CH. **Can. J. Microbiol.** 46: 370–375.

MAIDAK, B. L.; OLSEN, G. J.; LARSEN, N.; OVERBEEK, R.; McCAUGHEY, M. J.; WOESE, C. R.; The RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, 1997, Vol. 25, No. 1

MANGIN, I.; CORROLER, D.; REINHARDT, A.; GUEGUEN, M. Genetic diversity among dairy *lactococcal* strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. **J. Appl. Microbiol.** 86, 514-520, 1999.

MAJETI, N.; KUMAR, R.; **React. Funct. Polym.** 2000, 46, 1.

MARTIN, J. K. The influence of rhizosphere microflora on the availability of ³²P-myoinositol hexophosphate phosphorus to wheat. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, p. 473-483, 1973.

MASSINI, K. C. **Bioprospecção de genes biossintéticos de policetídeos de DNA metagenômico de solo da Mata Atlântica**. Tese de Doutorado em Ciências

(Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual de São Paulo, 2009.

MCLAREN, D., HUANG, H. AND RIMMER, S. Control of apothecia production of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* and *Talaromyces flavus*. **Plant Dis.** 80, 1373– 1378, 1996.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, n.2, p.337-342, 1995

MELO, I. S. de; Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de; In: **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.

MISKO, A.L.; GERMIDA, J.J. Taxonomic and functional diversity of *pseudomonas* isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, Canadá, v. 42 p. 399-407, 2002.

MIRZA, M.S., AHMAD, W., LATIF, F., HAURAT, J., BALLY, R., NORMAND, P., MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant ; Soil** 237, 47–54, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras – Editora UFLA – Universidade Federal de Lavras, cap. 9 p. 449- 541, 2006.

MONREAL, J.; REESE, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Can J Microbiol** 15, 689–696, 1969.

MUSSON, G.; Mc INROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Science and Technology**, v.5, n.4, p.407-416, 1995.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITIERLINDER, A. G. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 695-700, Mar. 1993.

NAUTIYAL, C. S.; BHADAURIA, S.; KUMAR, P.; LAL, H.; MONDAL, R.; VERMA, D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiol Lett** 182:291–296, 2002.

NISHIJIMA, T., TOYOTA, K., MOCHIZUKI, M. Predominant culturable *Bacillus* species in Japanese arable soils and their potential as biocontrol agents. **Microb. Environ.** 20, 61–68, 2005.

OLIVARES, F. **Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. *Biologia do Solo – Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência dos Solos*, p. 33-34, Janeiro-Abril, 2009.

OLIVEIRA, A. L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p.205-215, 2002.

OLSEN, G. J.; WOOSE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **J. Bacteriol.**, v. 176(1) p. 1–6, 1994.

PACE, N. R.; A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. **Science**, vol. 276, p. 734-7402, May 1997.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V.; **Enzyme Microb. Technol.** 26, 473, 2000.

PATTEN, C.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Can. J. Microbiol.** vol.42, p.207-220, 1996.

PELEGRINI, B.; **Girassol: uma planta solar das Américas conquistou o mundo**, Ícone: São Paulo, 2003.

PEREIRA, B. A.; CASTRO-SILVA, M. A. Rizobactérias formadoras de endósporos associadas a *Tibouchina urvilleana* de áreas impactadas por rejeitos da mineração do carvão. **R. Bras. Ci. Solo**, 34:563-567, 2010.

PIAO, C. G.; TANG, W. H.; CHEN, Y. X. Study on the biological activity of yield-increasing bacteria. **Chin J. Microecol** 4, p. 55-62, 1992.

PILLAY, V. J.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 354-361, 1997.

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

REGINATO-D'ARCE, M.A.B. ; FERRARI, R.A. **Grãos e óleos vegetais: matérias-primas**. LAN/ESALQ/USP. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/2444materiasprimas.pdf>; 2005.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Aust. J. Plant Physiol.** 28: 897–906, 2001.

RODRIGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bactéria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

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.

RÖSCH, C. ; BOTHE, H. Improved Assessment of Denitrifying, N₂-Fixing, and Total-Community Bacteria by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Multiple Restriction Enzymes **Applied and Environmental Microbiology**, April 2005, p. 2026-2035, Vol. 71.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487, 1988.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **Microbiol. Rev.** 1993, 11, 317.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. Proc. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). **Biochemistry**, Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467, **Nati. Acad. Sci. USA**, December 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.

SAVCHUK, W.G. S.; FERNANDO, D. **FEMS Microbiology Ecology** 49 (2004) 379–388.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal. Biochem.** 160, 47–56, 1987.

SCHARDL, C.L.; PHILLIPS, T.D. Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? **Plant Disease**, v.81, n.5, p.430-438, 1997.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. R.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; NUNES, F. V.; **Microrganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiente, Jaguariúna, SP - Junho, 2006.

SILVA, M. L. O.; FARIA, M. A.; MORAIS, A. R.; ANDRADE, G. P.; LIMA, E. M. C.; Crescimento e produtividade do girassol cultivado na entressafra com diferentes lâminas de água. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.11, n.5, p.482–488, 2007

SILVEIRA, A. B. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores do crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2008.

- SINGH, S.; KAPPOR, K. K. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. **Mycorrhiza** 7, 249-253, 1998.
- SHIMIZU, M.; NAKAGAWA, Y.; SATO, Y.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHYIDA, R.; KUNOH, H. Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. Isolated from rhododendron and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, v.66, p.360-366, 2000.
- SKRARY, F.A., CAMERON, D.C. (1998). Purification and characterization of a *Bacillus licheniformis* phosphatase specific for d-alpha-glycerophosphate. **Arch. Biochem. Biophys.** 349: 27-35.
- SOLANO, B. R., MAICAS J. B., PEREYRA DE LA IGLESIA M. T., DOMENECH J., AND GUTIÉRREZ MAÑERO F. J. Systemic Disease Protection Elicited by Plant Growth Promoting Rhizobacteria Strains: Relationship Between Metabolic Responses, Systemic Disease Protection, and Biotic Elicitors. **Phytopathology** Vol. 98, p. 451-457 No. 4, 2008.
- SOUZA, W. L.; FERRARI, R. A.; SCABIO, A.; BARCARO, P.; Biodiesel de óleo de girassol e etanol. **Biomassa e Energia**, v. 2., n. 1, p. 1-5, 2005.
- STENLID, J., KARLSSON, J. O., HOGBERG, N., 1994. Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. **Mycological Research**. 98:57-63.
- STRIGUL, N. S.; KRAVCHENKO, L. V. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. **Environmental Modelling ; Software** 21: 1158 e 1171, 2006.
- STROBEL, G. A. ; DAISY, B. 2003 Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol. Biol. Rev.** 67, p. 491-502.
- SUZUKI, M., GIOVANNONI, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. 62:625-630.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.719
- TANG, W.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Stimulation of canola root growth by *Pseudomonas putida* GR12-2 and its genetically engineered derivatives. **Plant Physiol (Life Sci Adv)** 13, p.89-95, 1994.
- TEIXEIRA, K. R. S.; **Parâmetros para quantificação e análise da diversidade de microrganismos presentes em amostras ambientais**. EMBRAPA- CNPAB - Documentos 167, Seropédica – RJ, 2003
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBEL, D. H. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum*

americanum L.). **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1016-1024, May 1979.

THOMPSON, F. L.; OLIVEIRA V. M.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; INÁCIO, C. A.; SELEGHIN, M. H. R.; KITAJIMA, E. W. **Taxonomia: microbiana, de procariontes, de fungos, de protozoários e de vírus**. Brasília: CGEE, 2005. 53p

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S *rRNA*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.44, n.4, p.384-391, abr. 2009

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology** 2002, 5:240–245

VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M. ; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria Annu. **Rev. Phytopathol.** 36, p. 453-483, 1998.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Appl Microbiol Biotechnol** 71: 137–144, 2006.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water Rice. **J. Biotechnol** 91, 127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil** 255: 571–586, 2003.

WEISBURG, Q. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, Jan. 1991, p. 697-703.

WELSH, J. ; MCCLELLAND, M. 1990 Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** 18, p. 7213-7218.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. ; TINGER, S. V. 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18, p. 6531-6535.

WINKELMANN, G. (1991) Importance of siderophores in fungal growth, sporulation and spore germination. In: **Hawksworth DL (ed) Frontiers in mycology**. CAB International, Wallingford, pp 49–65

WIWAT, C.; SIWAYAPRAHM, P.; BHUMIRATANA, A.; **Curr. Microbiol.** 1999, 39, 134.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, v.51, 221-271, 1987.

XIE, G.H., CAI, M.Y., GUANG, C.T., STEINBERGER, Y., 2003. Cultivable heterotrophic N₂-fixing bacterial diversity in rice fields in the Yangtze River Plain. **Biol. Fertil. Soils** 37, 29–38.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; G. NORMA. ***Pseudomonas spp. Fluorescentes – Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e Biocontroladoras de Fitopatógenos em Sistemas de Produção Agrícola***. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Agrobiologia. DOCUMENTO N° 127, ISSN 0104-6187, Dezembro/2000.

ZAKHAROVA, E.A.; SHCHERBAKOV, A.A.; BRUDNIK, V.V.; SKRIPKO, N.G.; BULKHIN, N.S.; IGNATOV, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v.259, p.572-576, 1999.

ANEXOS

ANEXO A – Meio de cultura Dygs (RODRIGUES NETO, et al., 1986)

2 g de glicose,

1,5 g de peptona,

2 g extrato de levedura,

0,5 g de K_2HPO_4

0,5 de $MgSO_4$

1 L de água destilada

Ajustar o pH 6,0

Autoclavado por 20 min a 121 °C.

ANEXO B – Meio Novo Fábio (DÖBEREINER et al., 1995)

5 g ácido málico,

0,5 g K_2HPO_4 ,

0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

0,1g NaCl,

0,02 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,

4,5 g KOH,

2,5 g ágar,

2 mL micronutrientes,

2 mL azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH),

4 mL de FeEDTA,

1 L de água destilada

pH 6,5

Autoclavado por 20 min a 121 °C.

ANEXO C – Meio para produção de quitinase (MONREAL ; REESE, 1969)

5 g de quitina em pó,

0,5 g de extrato de levedura,

1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

1,36 g de KH_2PO_4 ,

1 L de água destilada

ajustado ao pH 8,5

Autoclavado por 20 min a 121 °C.

ANEXO D – Meio para Solubilização de Fosfato (NAUTIYAL, 2002)

10 g glicose,

2,5 g CaHPO_4 ,

0,2 g NaCl ,

0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0,2 g KCl ,

0,5 g extrato de levedura,

0,002 g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0,002 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0,024 g azul de bromofenol,

1 L de água destilada

pH 7.0

Autoclavado por 20 min a 121 °C.

ANEXO E – Manuscript: Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower

Elsevier Editorial System(tm) for Soil Biology and Biochemistry

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower

Article Type: Research Paper (FLA)

Keywords: Endophytic bacteria; Bacillus; RAPD; 16S rRNA gene.

Corresponding Author: Mr Andre Luiz Martinez Oliveira, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Estadual de Londrina

First Author: Kelly Campos Guerra P de Goes, MsC

Order of Authors: Kelly Campos Guerra P de Goes, MsC; Maria Luisa C Fisher, MsC; Alexandre J Cattelan, Ph.D.; Marco A Nogueira, Ph.D.; Claudio Guilherme P Carvalho, Ph.D.; Andre Luiz Martinez Oliveira, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Suggested Reviewers: Fabio L Olivares Ph.D

Professor/Researcher, CCB/LBCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense

fabio.olivares@gmail.com

George Lazarovits

lazarovitsg@agr.gc.ca

Claudia M Ribaudó

ribaudó@agro.uba.ar

Covering Letter

Dear Soil Biology and Biochemistry Editor

We would like to submit our manuscript, "Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower" for publication in your Journal. Many agricultural crops have been shown to potentially benefit from the use of inoculants containing plant growth-promoting bacteria, and some have already had their associated bacterial community characterized. In the literature, there are few studies aiming to characterize microorganisms associated with the sunflower. By analysis of genetic diversity and characterization of the high density microbial community associated with the sunflower crop, we were able to identify relevant species for use as an agricultural input, and we discuss the findings in comparison with the literature.

We appreciate your consideration in reviewing our manuscript. If you have any further questions please contact us.

Sincerely,

Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Department of Biochemistry and Biotechnology, Universidade Estadual de Londrina



American Journal Experts Editorial Certification

This document certifies that the manuscript titled "Biochemical and molecular characterization of high population bacteria isolated from sunflower" was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process.

Documents receiving this certification should be English-ready for publication - however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns over this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com.

Manuscript title: Biochemical and molecular characterization of high population bacteria Isolated from sunflower

Authors: Kelly Campos Guerra Pinheiro de Goes; Marla Luisa de Castro Fisher¹; Alexandre José Cattelan²; Marco Antonio Nogueira²; Claudio Guilherme Portela de Carvalho²; André Luiz Martinez de Oliveira³

Key: DF83-151F-4443-5351-D913

This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate.

American Journal Experts is an association of Ph.D. and Ph.D. graduate students from America's top research universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information, please visit www.journalexperts.com, or for volume discounts for academic journals, please contact us by email at sales@journalexperts.com

***Highlights**

Highlights

Bacillus sp. prevail in the high population density endophytic bacteria of sunflower >
Methylobacterium sp. was found as endophyte colonizing the sunflower florets> Plant
growth-promotion traits were common among the high population density isolates>
Potential inculant strains could be selected for sunflower inoculation.

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 Type of contribution: original paper

2 Number of text pages: 26

3 Number of tables: 3

4 Number of Figures: 3

5

6 **Title: Biochemical and molecular characterization of high population**

7 **density bacteria isolated from sunflower**

8 Kelly Campos Guerra Pinheiro de Goes^a; Maria Luisa de Castro Fisher^a;

9 Alexandre José Cattelan^b; Marco Antonio Nogueira^b; Claudio Guilherme Portela

10 de Carvalho^b; André Luiz Martinez de Oliveira^a

11

12 Kelly Campos Guerra Pinheiro de Goes^a

13 ^a Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de

14 Londrina

15 Rodovia Celso Garcia Cid, Pr -445, Km 380, Campus Universitário

16 Cx. Postal 6001, CEP 86051-980, Londrina – Paraná -Brasil

17 E-mail: kellygoes@uel.br

18

19 Maria Luisa de Castro Fisher^a

20 ^a Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de

21 Londrina

22 Rodovia Celso Garcia Cid, Pr -445, Km 380, Campus Universitário

23 Cx. Postal 6001, CEP 86051-980, Londrina – Paraná -Brasil

24 E-mail: mariadcf.bio@gmail.com

25

26 Alexandre José Cattelan^b

27 ^b Embrapa Soja

28 Rodovia Carlos João Strass, Distrito de Warta

29 Cx. Postal 231, CEP 86001-970, Londrina – Paraná -Brasil

30 E-mail: cattelan@cnpso.embrapa.br

31

32 Marco Antonio Nogueira^b

33 ^b Embrapa Soja

34 Rodovia Carlos João Strass, Distrito de Warta

35 Cx. Postal 231, CEP 86001-970, Londrina – Paraná -Brasil

36 E-mail: noqueira@cnpso.embrapa.br,

37

38 Claudio Guilherme Portela de Carvalho^b

39 ^b Embrapa Soja

40 Rodovia Carlos João Strass, Distrito de Warta

41 Cx. Postal 231, CEP 86001-970, Londrina – Paraná -Brasil

42 E-mail: cportela@cnpso.embrapa.br

43

44 André Luiz Martinez de Oliveira^a, Corresponding Author

45 ^a Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de

46 Londrina

47 E-mail: almoliva@uel.br

48 Rodovia Celso Garcia Cid, Pr -445, Km 380, Campus Universitário

49 Cx. Postal 6001, CEP 86051-980, Londrina – Paraná -Brasil

50 Telephone: 55-43-33714270, Fax: 55-43-33284440

51 Biochemical and molecular characterization of high population density

52 bacteria isolated from sunflower

53 Abstract

54 Natural and beneficial associations between plants and bacteria have
55 demonstrated potential commercial application for several agricultural crops.
56 The sunflower has acquired increasing importance in Brazilian agribusiness due
57 to its agronomic characteristics and the versatility of the products and by
58 products obtained from its cultivation. A study of the cultivable bacteria
59 associated with two sunflower cultivars, using classical microbiological
60 methods, successfully obtained isolates from different plant tissues (roots,
61 stems, florets, and rhizosphere). Out of 57 plant-growth-promoting isolates
62 obtained, 45 were identified at the genus level and phylogenetically positioned
63 based on 16S rRNA gene sequencing: 42 *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B.*
64 *thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, and *Bacillus* sp.) and 3
65 *Methylobacterium komagatae*. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)
66 analysis showed a broad diversity among the *Bacillus* isolates, which clustered
67 into 2 groups with 75 % similarity and 13 subgroups with 85 % similarity,
68 suggesting that the genetic distance correlated with the source of isolation. The
69 isolates were also analyzed for certain growth-promoting activities. Auxin
70 synthesis was widely distributed among the isolates, with values ranging from
71 93.34 to 1653.37 μM auxin per μg of protein. The phosphate solubilization index
72 ranged from 1.25 to 3.89, and siderophore index varied from 1.15 to 5.25. From
73 a total of 57 isolates, 3 showed an ability to biologically fix atmospheric nitrogen,
74 and 7 showed antagonism against the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. The

75 results of biochemical characterization allowed identification of potential
76 candidates for the development of biofertilizers targeted to the sunflower crop.

77 **Keywords:** Endophytic bacteria; *Bacillus*; RAPD; 16S rRNA gene.

78

79 **1. Introduction**

80 World agriculture is under a new paradigm: to achieve sustainability without
81 decreasing productivity. The increase of the global population, changes in
82 climate, the needs to reduce greenhouse gas emissions, and the need to
83 increase crop productivity can be considered the main future challenges in
84 agriculture. In this sense, understanding the ecology and dynamics of plant
85 associated bacteria, as well as their implications for plant physiology and
86 development, is of great importance. Such microbial communities play
87 important roles in plant nutrition, the efficiency of nutrient use, and the
88 protection of crops against biotic and abiotic stresses. Several bacterial groups
89 isolated from different plant species have been previously described, and many
90 of them have demonstrated plant growth-promoting properties. Such bacteria
91 are generally termed “plant growth-promoters” (Glick, 1995, Hallmann et al.,
92 1997, Lucy et al., 2004).

93 Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are generally found colonizing the
94 intercellular spaces of the plant (in which case they are termed endophytic
95 bacteria) or colonizing the rhizosphere (termed rhizobacteria). Virtually all plant
96 species are associated with one of these groups, making the PGPB of great
97 ecological and biotechnological importance. Several mechanisms of growth

98 promotion have been identified (Vessey, 2003). The main genera of PGPB
99 include *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*,
100 *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, and *Burkholderia* (Lugtemberg and
101 Kamilova, 2009). From these genera, several commercial formulations are
102 available for use as inoculants for commercial crops, mainly developed for
103 grasses (Bashan, 1998).

104 Oilseed crops have gained increasing importance in agribusiness due to their
105 versatility of use in human and animal food, as well as biofuel. Nevertheless,
106 studies regarding the PGPB species in association with oilseed crops are
107 scarce, with few reports performed for the sunflower crop (Fagis and Arsac,
108 1991; Forchetti et al. 2007). Sunflower seeds contain a high-quality oil which
109 accounts for 39% to 49% of a seed's total mass, with the yield influenced by the
110 plant genotype and soil nutrients, specifically nitrogen and phosphorus. Both
111 nutrients are directly correlated to the seed and oil yields, as well as oil quality
112 (Lakshminarayana, 1993).

113 Improvement of nutrient uptake and/or plant nutritional status can be achieved
114 by the use of selected bacteria, as observed with legumes and grasses (Boddey
115 and Dobereiner, 1995). However, large-scale application of inoculant PGPB on
116 commercial crops suffers from inconsistency in field trials, probably due to the
117 numerous and complex interactions that influence the compatible establishment
118 of a PGPB host-plant association. For this reason, bioprospection of PGPB in
119 association with different plant species can identify the isolates most likely to
120 form compatible interactions with specific plant species, and in this way the
121 growth-promoting effect of the association can be fully utilized.

122 The aim of this work was to contribute to the knowledge about high population
123 density bacterial diversity in association with the sunflower, which was
124 accomplished through isolation, identification, and evaluation of the genetic
125 diversity, characterization of the cultivable PGPB found in association with
126 sunflower and identification of potential isolates to develop inoculant
127 formulations.

128

129 **2. Material and methods**

130

131 **2.1 Plant material and bacterial isolation**

132 Two different plant genotypes (Aguará 3 and Hélio 251) were used in the
133 present study to isolate bacterial strains associated with different tissues of
134 sunflower. Plants of both genotypes were grown in a low fertilizer input system
135 at the Embrapa Soybean experimental field, located in the Paraná State, Brazil.
136 These genotypes were chosen because of their recommended growth
137 conditions in medium to low soil fertility and their wide suitability in Brazilian
138 edaphoclimatic conditions. Five plants of each genotype were sampled at the
139 flower bud phase (E 4) and split into rhizosphere soil, roots, stem, and florets.
140 The plant tissues were surface-sterilized by immersion in 2% hypochlorite
141 solution for 15 min and rinsed 3 times for 15 min with sterile distilled water. Five
142 grams of each plant tissue or rhizosphere soil was ground in 1:10 (w/v) saline
143 solution (0.9% NaCl) and serially diluted up to 10^{-7} . One hundred microliters of
144 the 10^{-5} to 10^{-7} dilutions were used to inoculate semi-solid N-free media LGI,

145 NFb and JMV (in 3 replica vials for each dilution), and Dygs solidified rich
146 medium was also inoculated to estimate the “total” culturable bacteria
147 (Döbereiner et al., 1999). The inoculated media were incubated at 28 °C for 7 to
148 8 days, and then a bacterial count was performed using the most probable
149 number (MPN) method or the colony-forming unit (CFU) method. Bacterial
150 colonies and pellicles present in the higher dilutions were streaked on Dygs
151 medium for purification. Purified bacterial isolates were maintained in liquid
152 glycerol:Dygs (1:1, v/v) at –20 °C until used for molecular and biochemical
153 characterization.

154

155 **2.2 Identification and molecular diversity of bacterial isolates**

156 Total DNA was extracted from the sunflower isolates using the
157 phenol:chloroform method (Sambrook et al., 1989) and used for molecular
158 analysis. The ribosomal 16S rRNA gene was partially amplified in PCR
159 reactions using the universal primers 27F and 778R (Rösch and Bothe, 2005).
160 The amplification products were electrophoresed on 1.0% agarose gel and
161 photographed. The amplicons were purified using the PureLink PCR purification
162 Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad) according to the manufacturer’s
163 instructions and were sequenced using the DYEnamic™ ET Dye Terminator
164 Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.). The sequencing
165 output was analyzed using the Ribosomal Database Project Classifier (Wang et
166 al., 2007) to identify the strains at the genus level, and a phylogenetic tree was
167 constructed to specifically position each strain in the genera. Nucleotide
168 sequences were aligned using Clustal 2.0.12 (Larkin et al., 2007) and refined by

169 manual correction using Bioedit 7.0.5.2 (Hall, 1999). Ribosomal gene
170 sequences of type species were downloaded from the Ribosomal Database
171 Project (RDP) databank and used to infer phylogenetic relationships. Bayesian
172 trees were constructed using MrBayes 3.1.2 software (Ronquist and
173 Huelsenbeck, 2003). Markov chain Monte Carlo (MCMC) searches were run
174 until the standard deviation of split frequencies fell below 0.01, with trees
175 sampled every 250 generations. The first quarter of the trees generated (25% of
176 the trees) were discarded to build the phylogram.

177 The 16S rRNA gene sequences allow only limited diversity analysis. Therefore,
178 genotypic diversity was further evaluated using the random amplified
179 polymorphic DNA (RAPD) technique using the primers M13 (Huey and Hall,
180 1989), 1254 (Akopianz et al., 1992), P2 and P3 (Mangin et al., 1999). Band
181 patterns from the amplified RAPD products were digitally photographed, and
182 data were analyzed using GelQuest[®] (version 2.1.2) software. Each reaction
183 was performed in triplicate. Consistent polymorphism patterns were used to
184 calculate the Jaccard coefficient and subjected to unweighted pair group
185 method with arithmetical averages (UPGMA) analysis to construct a
186 dendrogram using the NTSYS-pc (version 2.1) software package.

188 **2.3 Determination of plant growth-promoting ability**

189 **2.3.1 Biological nitrogen fixation**

190 The ability to biologically fix atmospheric nitrogen was evaluated by growing the
191 strains in tubes containing Nfb semisolid N-free media and incubating for 3

192 days at 28 °C (Roesch et al., 2007). The isolates that presented positive growth
193 and pellicle formation were selected and transferred to fresh NFb semisolid N-
194 free media. This procedure was repeated 5 times consecutively to assure each
195 isolate's ability to fix nitrogen. Bacterial isolates considered diazotrophs were
196 submitted to molecular detection of the *nifH* gene through PCR amplification
197 using the primers described by Piceno et al. (1999). The presence of a single
198 amplicon of the expected size (approximately 469 base pairs) was assumed as
199 an amplification of the *nifH* gene. The diazotrophic bacterium *Azospirillum*
200 *brasiliense* AbV5 was used as a positive control for both assays.

201 **2.3.2 Auxin synthesis**

202 The Salkowski assay for quantification of indolic compounds was applied to
203 estimate the production of indole acetic acid (IAA) by the sunflower isolates.
204 The IAA concentration in cultures was normalized to the total protein content,
205 and the results were expressed as μM IAA per μg of protein according to the
206 procedure of Rodrigues et al. (2008). Experiments were performed in triplicate.

207 **2.3.3 Siderophore production**

208 Siderophore production was tested using the method of Schwyn and Neilands
209 (1987), with modifications. One drop of bacterial cultures grown in Dygs liquid
210 medium was inoculated onto plates containing Dygs solid medium
211 supplemented with Chrome Azurol S (CAS), 72.9 mg CTAB and 5 mL of Fe^{+3}
212 solution (1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HCl), and plates were incubated for 3 days
213 at 28 °C. Detection of orange color in a halo around the colonies was assumed
214 as the ability to produce siderophores. The ratio between the halo diameter and

215 the colony diameter, named siderophore index (SI), was used to rank the
216 isolates based on siderophore production. Experiments were performed in
217 triplicate.

218 **2.3.4 Phosphate solubilization**

219 To address the potential for phosphate solubilization, each bacterial strain was
220 streaked on NBRIP plates and cultivated for 7 days at 28 °C (Nautiyal, 2000).
221 The presence of transparent haloes surrounding the bacterial colonies indicated
222 the phosphate solubilization potential. The ratio between the halo diameter and
223 the colony diameter was used to determine the P-solubilization index (PSI) and
224 to rank the isolates according to the phosphate solubilization potential. The
225 measures were performed in triplicate.

226 **2.3.5 Antifungal activity**

227 The bacterial strains were tested in vitro for antifungal activity against
228 *Sclerotinia sclerotiorum* by dual culture test. Seven-day-old *S. sclerotiorum*
229 mycelia grown on PDA (Acumedia®) culture medium were transferred to one
230 side of Petri dishes containing Dygs medium, and then two-day-old bacterial
231 colonies grown on Dygs solid medium were streaked on the opposite side of the
232 assay plates. Antifungal activity was assessed after 10 days of incubation in the
233 dark at room temperature. Bacterial isolates that maintained the fungal mycelia
234 more than 1 cm away were considered as antagonists of *S. sclerotiorum*. To
235 confirm and quantify the plate assay, a pairing method on standard potato
236 dextrose was used according to Araújo et al. (2005). Pure bacterial and fungal

237 cultures were used as controls, and the experiments were performed in
238 triplicate.

239

240 **3. Results**

241 **3.1 Bacterial isolates**

242 A total of 57 bacterial strains were obtained from rhizosphere soil, roots, stem
243 and florets from both sunflower genotypes (Aguará 3 and Hélio 251) (Table 1).
244 No significant difference in bacterial density was observed between the
245 sunflower genotypes overall. Nevertheless, the rhizosphere of the cultivar
246 Aguará 3 harbored the highest bacterial population density (up to 8.9×10^6 CFU
247 per gram), while the florets of the same cultivar had the smallest population
248 density (up to 2.3×10^4 CFU per gram). A higher number of different colony
249 morphotypes was isolated from the cultivar Hélio 251. Out of all the isolates
250 obtained from both sunflower genotypes, 18 came from the rhizosphere soil, 13
251 from the roots, 14 from the stems, and 12 from the florets (Table 1).

252 **3.2 Identification and molecular diversity of the isolates**

253 The RDP Classifier allowed the identification of 42 strains belonging to the
254 *Bacillus* genus plus 3 strains belonging to *Methylobacterium* genus (Table 2).
255 The 12 remaining unidentified isolates rendered low sequence quality, and the
256 contigs of these sequences could not be assembled. The phylogenetic analysis
257 of the 16S rRNA gene sequences of 42 strains isolated from sunflower, and
258 some type strains of *Bacillus* species, is presented in Figure 1. A broad
259 phylogenetic analysis including 182 16S rRNA gene sequences from *Bacillus*

260 type strains deposited in databanks was performed prior to selecting the
261 species presented. Figure 2 shows the phylogenetic analysis of the 16S rRNA
262 sequences from 3 strains isolated from sunflower and type strains of
263 *Methylobacterium* species. Distance-based phylogeny grouped the new strains
264 into 6 *Bacillus* species and 1 *Methylobacterium* species, in addition to 7
265 unidentified *Bacillus*.

266 The *B. amyloliquefaciens*-like strains ZA, CB, ZD, TSAB, and T2AF clustered
267 with the type strain, with 16S rRNA gene sequence similarities of 96.5-99.5%.
268 The *B. subtilis*-like strain CJ shared 99.6% sequence similarity to the type
269 strain. The *B. megaterium*-like strains CG, CI, ZR, RA, RD, RE, RG, RM, RO,
270 ZO, and RC shared sequence similarity of 95.3-99.6% to the type strain. The *B.*
271 *pumilus*-like strains ZF, ZE, T1AG, and RI clustered with the type strain, with
272 sequence similarities of 98.5-99.5%. The *B. cereus*-like strains CL, RN, RK,
273 T2AJ, CC, CK, CD, CH, RP, and CF were positioned closer to the type strain,
274 with sequence similarities of 98.2-100%. The *B. thuringiensis*-like strains RB,
275 T4AL, RF, and T4AE presented with 98.9-99.8% of sequence similarity to the
276 type strain. The strains CA, ZB, ZI, ZJ, RJ, ZG, and CE did not cluster within
277 any *Bacillus* type strain. The *Methylobacterium*-like strains TSAA, ZM and ZQ
278 grouped with *M. komagatae* type strain, with 16S rRNA gene sequence
279 similarities of 97.8-98.4% (Figure 2). Interestingly, these isolates were identified
280 as endophytes on the Hélio 251 cultivar only (Table 2).

281 To compare the genotypic redundancy among the strains, the RAPD-PCR
282 technique was used. A total of 128 RAPD markers were obtained with the
283 primer set used, with fragments varying from 100 to 5000 bp. The dendrogram

284 derived from UPGMA cluster analysis based on the combined similarity matrix
285 presents the genomic diversity among the sunflower isolates (Figure 3). As a
286 result, 2 main groups were distinguished at 75% similarity, and 13 subgroups
287 were formed at 85% of similarity. Group 1 comprised mainly bacterial strains
288 obtained from surface-sterilized plant tissues and hence were considered as
289 endophytes. Group 2 was formed mainly by rhizosphere isolates. At a higher
290 level of similarity, a clear delineation between isolates derived from the same
291 plant tissue could be observed, as well as clonal relationships among some
292 isolates. Subgroups 1 and 2 were formed by endophytic *Bacillus* strains isolated
293 from sunflower stems of both cultivars. Subgroup 3 showed no clear distinction
294 between strains according to the plant tissue of origin. Subgroups 4 and 5 were
295 formed mainly by endophytic *Bacillus* from roots of both cultivars. Strains ZQ
296 and TSAA (both *M. komagatae*-like strains) formed separate clusters at
297 subgroups 6 and 9, respectively. Subgroups 7 and 8 comprised endophytic
298 *Bacillus* strains obtained from florets. Subgroups 10 and 13 were formed mainly
299 by rhizosphere strains, and subgroups 11 and 12 contained exclusively
300 rhizosphere *Bacillus* (Figure 3).

301 Clonal relationships were identified between strains obtained from different
302 sunflower cultivars, as observed with the isolates ZB (rhizosphere, Aguará 3)
303 and CK (stem, Hélio 251), which shared 98.7% of 16S rRNA gene sequence
304 similarity, and isolates T3AL (florets, Aguará 3), T4AE (florets, Hélio 251), and
305 T4AL (florets, Aguará 3), with these last two sharing sequence similarity of
306 99.7%. Indeed, clonal relationships among isolates obtained from the same
307 sunflower cultivar but from different plant tissues were also identified, as

308 represented by the strains RI and T5AL (not sequenced), and strains ZD and
309 CB had 97% sequence similarity. Clonally-related strains were also identified for
310 the strains RJ and RK (both being obtained from root samples and sharing
311 99.0% of sequence similarity), rhizosphere strains ZA and ZC (not sequenced),
312 strains ZE and ZK (not sequenced), and strains ZI and ZG (showing 99.4% of
313 16S rRNA gene sequence similarity).

314 3.3 Plant growth-promoting traits

315 *Bacillus* isolates CH, T1AG, and ZR (putative *B. cereus*, *B. pumilus*, and *B.*
316 *megaterium*, respectively) were considered as having biological nitrogen fixation
317 (BNF) potential (Table 2). Although these isolates grew well in N-free NFb semi
318 solid medium for 5 consecutive subculturings, the amplification of the *nifH* gene
319 using the primers described by Piceno et al. (1999) failed for these isolates,
320 despite the fact that amplicons of the expected size were obtained for the
321 control strain. For this reason, the BNF trait was only assumed as BNF
322 potential.

323 The production of indolic compounds was observed in 52 out of 57 isolates, in a
324 range varying from 93 to 1,653 μM IAA per μg protein (Table 2). The highest
325 value was recorded for the strain RP, phylogenetically related to *B. cereus*.
326 Bacterial strains that presented values of auxin production greater than 850 μM
327 AIA per μg of protein were considered as a high-potential PGPB (Table 3). A
328 total of 9 strains were considered high IAA producers.

329 The ability to produce siderophores was identified in a total of 32 isolates,
330 based on the observation of a clear halo surrounding the bacterial colonies

331 (Table 2). The siderophore index (SI) varied in a range from 1.15 to 5.25, and
332 strains that presented indices higher than 2.5 were considered as having a high
333 PGPB potential on this trait (Table 3). A total of 14 isolates were considered as
334 a high siderophore producers, with the best index being found for the isolate
335 RF, a strain phylogenetically related to *B. thuringiensis*.

336 Phosphate solubilization was observed in a total of 12 strains. The P-
337 solubilization index (PSI) varied from 1.25 to 3.89, with the higher value
338 observed for the strain ZA, phylogenetically related to *B. amyloliquefaciens*
339 (Table 2). Arbitrary values of P-solubilization index were chosen to classify the
340 isolates according to their potential for this trait, with 6 strains presenting a PSI
341 higher than 2.5 and being considered high-potential PGPB (Table 3).

342 A total of 7 isolates were identified as having antagonistic activity against the
343 pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Table 2), 6 of which were
344 considered high-potential PGPB according to the inhibition-halo size (IH). The
345 quantification of the inhibition haloes presented values ranging from 1.2 cm to
346 1.9 cm, with the highest antagonistic effect being observed in the *Bacillus* sp.
347 strain CM, not sequenced (Table 3).

348 Considering the results of plant growth-promotion characterization of the
349 sunflower strains, high-potential candidates for further sunflower inoculation
350 could be selected. From the total of 57 strains obtained from the 2 sunflower
351 genotypes, 5 of them presented at least 2 different plant growth-promotion traits
352 in high potential: endophytic strains T1AG (BNF potential and siderophore
353 production), T4AL (siderophore production and plant protection against *S.*
354 *sclerotiorum*), CM (auxin synthesis, P-solubilization, and plant protection

355 against *S. sclerotiorum*) and CB (auxin synthesis and siderophore production)
356 and the rhizosphere strain ZR (BNF potential and siderophore production).

357 4. Discussion

358 The distribution of the bacterial species associated with plants is controlled by
359 several factors, including plant genotype, plant age, climate conditions, soil
360 characteristics (Kuklinsky-Sobral et al., 2005), and soil water content. This study
361 presents the diversity of high-density bacterial strains in association with 2
362 different sunflower cultivars, collected under the same edaphoclimatic
363 conditions. Considering the data, the main factor influencing the diversity of
364 bacterial communities in this study was the plant genotype. No significant
365 differences in bacterial density were observed among the populations
366 associated with both plant genotypes. Nevertheless, the diversity of the
367 bacterial isolates suggested qualitative differences regarding the populations in
368 association with each sunflower genotype. Indeed, the higher level of diversity
369 and higher-density populations seen in the rhizosphere, compared to the
370 endophytic populations, are in agreement with the literature (Rosembueth and
371 Martinez-Romero, 2004).

372 The cultivar Aguará 3 generated a total of 6 bacterial strains in association with
373 sunflower roots and rhizosphere, corresponding to 10.5% of the total isolated
374 strains for this plant genotype. This differed from the belowground-associated
375 bacterial diversity of the cultivar Hélio 251, where a total of 25 different colony
376 morphotypes were isolated (corresponding to 43.8% of the total strains
377 isolated). In contrast, a higher number of different strains was obtained from the
378 aerial tissues of Aguará 3 (17 isolates, 29.8% of the total) than were obtained

379 from Hélio 251 (9 isolates, 15.8% of the total). This suggests a lower diversity in
380 a larger population of endophytic bacteria is associated with the Hélio 251
381 genotype (Table 1). The role of plant genotype in shaping the associated
382 bacterial population is unclear, but a similar observation has been previously
383 reported (Granér et al., 2003) and is in support of our findings. Vogt et al. (2010)
384 studied 17 sunflower genotypes in respect to morpho-physiological
385 characteristics and found a high cophenetic distance between the genotypes
386 Aguará 3 and Hélio 251, mainly directed by plant height (172 and 137 cm,
387 respectively) and days to flowering (75 and 67 days, respectively). Genotype
388 dependent morpho-physiological effects, along with signaling pathways involved
389 in plant-microbe communication, are believed to drive the size and composition
390 of non-pathogenic plant-associated bacterial populations (Ikeda et al., 2010).

391 With respect to the bacterial strains defined by the phylogenetic 16S rRNA gene
392 analysis (Figures 1 and 2), 9 out of 11 *B. megaterium*-like strains were obtained
393 from belowground tissues (81.8% of *B. megaterium*-like strains) and were
394 mainly from the Hélio 251 genotype. On the other hand, *B. cereus*-like strains
395 prevailed in the aboveground tissues (70% of the *B. cereus*-like isolates) and
396 were mainly from the Aguará 3 genotype. Both *B. megaterium* and *B. cereus*
397 are ubiquitous soil bacteria, and have been reported endophytically in field
398 grown plants (Surette et al., 2003). *Bacillus* strains related to *B. pumilus* also
399 showed split distribution of the plant genotype and site of colonization, being
400 found endophytically in Aguará 3 and only on the rhizosphere of Hélio 251
401 (Table 4). Another interesting finding was the isolation of the *M. komagatae*-like
402 strains exclusively from Hélio 251 and a single *B. subtilis* from Aguará 3. *M.*

403 *komagatae* and other *Methylobacterium* strains were recently described as P
404 solubilizers (Jayashree et al., 2011), however the isolates described here do not
405 present such a trait. The identification of methylobacteria colonizing field-grown
406 sunflower plants was previously reported (Schauer and Kutschera, 2008), but to
407 our knowledge the identification of endophytic *M. komagatae* in sunflower
408 tissues is reported for the first time here. The role of methylotrophs in
409 association with plants is not clearly understood.

410 Previous studies of bacterial isolation and diversity in association with sunflower
411 are scarce. Hence, the plant genotype-based comparative analysis provides
412 useful information about the composition of the high density bacterial
413 community associated with this crop. The results presented suggest an active
414 role of the sunflower plants in selectively recruiting such *Bacillus* species from
415 soil and supporting its population increase. This effect was previously reported
416 for *B. polymyxa* in wheat (Mavingui et al., 1992). These results cannot be widely
417 interpreted and may not reflect the true picture of the bacterial community
418 associated with the sunflower cultivars, so they must be interpreted according to
419 strict criteria. The use of phenotypic characteristics such as colony morphology
420 to select the bacterial isolates studied here could potentially bias the results.
421 Thus, relative and non-absolute populations were described in this work.

422 Fürnkranz et al. (2009) evaluated the bulk bacterial population associated with
423 sunflower and other crops in Bolivian fields, finding rhizosphere populations up
424 to 100 times larger than that reported here but endophytic populations up to 10
425 times smaller. Such discrepancies could be due to differences in soil and plant
426 genotypes, as well as the methodology used to obtain the isolates. Forchetti et

427 al. (2007) reported the isolation of 29 bacterial strains from sunflower root
428 tissues, from which 8 were considered diazotrophic and identified by 16S rRNA
429 gene sequences. Although the bacterial population density was not mentioned,
430 the majority of the sequenced isolates were identified as *B. pumilus*
431 homologous, and 1 isolate showed homology with *Achromobacter/Alcaligenes*.
432 In our results, almost all sequenced bacteria were also identified as belonging
433 to the *Bacillus* genus, divided into 6 different species. The ability of *Bacillus* to
434 associate with and express plant-growth-promoting traits in different plant
435 species, including in commercial inoculant strains (Mathre et al., 1999), has
436 already been reported in the literature (Ryder et al., 1999; Beneduzi et al.,
437 2008).

438 The plant growth-promoting activity of *Bacillus* strains includes direct and
439 indirect effects. Direct effects such as nitrogen fixation, phosphate solubilization,
440 and auxin synthesis are considered consistent indicators of potential
441 biofertilizers (Bashan, 1998; Vessey, 2003). Indirect effects, such as
442 antagonism against pathogens and siderophore production, are bacterial traits
443 useful in the development of plant-protection inoculants.

444 Diazotrophic *Bacillus* was identified based on its ability to grow in semi-solid N-
445 free NFb medium in consecutive cycles of subculturing, a procedure well
446 established to selectively isolate diazotrophic bacteria. The discrepancy
447 between the results of the culturing and molecular methods in detecting
448 diazotrophic bacteria could result from variability of this gene, and similar
449 reports are available in the literature (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

450 Phylogenetic analysis of the isolates CH, T1AG, and ZR suggests that they

451 belong to *B. cereus*, *B. pumilus*, and *B. megaterium*. Although the detection of
452 the *nifH* gene had been unsuccessful for the tested strains, nitrogen-fixing
453 *Bacillus* strains phylogenetically related to *B. pumilus* were previously isolated
454 in the sunflower (Forchetti et al., 2007) and other plants (Xie et al., 2006).
455 Nevertheless, the transference of fixed nitrogen by *Bacillus* to the plant has not
456 been determined at this point.

457 Most of the isolates obtained in this study showed the potential to produce
458 indoles on in vitro assay, including the *Methylobacterium* isolates. Among 57
459 isolates, only the strains ZE, ZF, ZH, and ZI did not present any of the plant
460 growth-promotion traits that were tested. Six isolates with high potential for P-
461 solubilization were identified, and strains related to *B. subtilis* (strain ZA), *B.*
462 *cereus* (strain CF), *B. megaterium* (strain RC), and *Bacillus* sp. (strains CM,
463 TSAD, and ZJ) equally distributed among the plant genotypes. On the other
464 hand, *Bacillus* strains antagonistic against *S. sclerotiorum* were isolated mainly
465 from Aguará 3, from which 5 out of 6 strains with high antagonistic activity were
466 isolated (Table 3). Siderophore production is a characteristic thought to play a
467 role in the biological control of pathogens by limiting iron availability.
468 Interestingly, only the *B. thuringiensis*-like strain T4AL was classified as highly
469 antagonistic and a high siderophore-producer, suggesting that the antagonistic
470 activity presented by the other strains could be due to the presence of another
471 active metabolite instead of siderophores.

473 5. Conclusions

474 This work reported the isolation, characterization and identification of PGPB in
475 association with sunflowers grown in the southern region of Brazil. Because

476 effective PGPB must be present in high levels to exert growth-promoting effects
477 (Lucy et al., 2004; Berg, 2009), we focused on isolating such bacterial groups.
478 *Bacillus* species predominated in our isolates, suggesting its ecological
479 relevance for the healthy development of sunflowers. Among the PGPB
480 characteristics identified in the *Bacillus* isolates, biological nitrogen fixation,
481 phosphorus solubilization, and antagonism against the fungal pathogen *S.*
482 *scerotiorum* are of the most interest for developing an inoculant-based
483 formulation. Tropical soils have characteristically low nitrogen levels and high P-
484 immobilization potential, and in some regions, pathogenic soil fungi are the
485 major limitations in sunflower cropping (Masirevic and Gulya, 1992). The
486 *Bacillus* strains described in this work are suitable candidates to develop
487 biotechnological tools, aiming to overcome such limitations and contribute to the
488 sunflower nutrition and the protection against soil pathogens when grown in
489 tropical countries.

490

491 Acknowledgements: The authors are grateful to Universidade Estadual de
492 Londrina and Embrapa Soja for logistic support. This work received financial
493 support from CAPES, CNPq and Fundação Araucária.

494

495 **References**

496 Akopianz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., Berg, D.E., 1992.
497 DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-
498 based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 20, 5137–5142.

499

500 Araújo, F.F., Henning, A.A., Hungria, M., 2005. Phytohormones and antibiotics
501 produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on
502 soybean root development, World Journal of Microbiology ; Biotechnology
503 21:1639–1645.

504

505 Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in
506 agriculture. Biotechnology Advances 16:729-770.

507

508 Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia,
509 L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting
510 activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. Applied
511 Soil Ecology 39, 311 – 320.

512

513 Berg, G., 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health:
514 perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied
515 Microbiology and Biotechnology, 84:11–18.

516

517 Boddey, R.M., Dobereiner, J., 1995. Nitrogen fixation associated with grasses
518 and cereals: recent results and perspectives for the future research. Fertilizers
519 Research, v. 42, p. 241-250.

520

521 Chaplin M.F., Kennedy J.F., 1994. *Carbohydrate Analysis*, 2th edn. New York:
522 Oxford University Press.

523

524 Döbereiner, J., Andrade, V.O., Baldani, V.L.D. 1999. Protocolos para preparo
525 de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: Embrapa
526 Agrobiologia, Documentos, 110, 38 p.

527

528 Fages, J., Arsac, J.F., 1991. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other
529 plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*, 137, p. 87-90.

530

531 Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., Abdala, G., 2007.

532 Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation,
533 characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture
534 medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, p. 1145–1152.

535

536 Fürnkranz, M., Müller, H., Berg, G., 2009. Characterization of plant growth
537 promoting bacteria from crops in Bolivia. *Journal of Plant Diseases and*
538 *Protection*, 116 (4), 149–155.

539

540 Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria.
541 *Canadian Journal of Microbiology*, 41, p. 109-117.

542

543 Granér, G., Persson, P., Meijer, J., Alström, S. 2003. A study on microbial
544 diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wild pathogen,
545 *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 224:269-276.

546

547 Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor
548 and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series,
549 41, 95-98.

550

551 Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffey, W.F., Kloepper, J.W., 1997.

552 Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology,

553 Ottawa, v. 43, p. 895-914.

554

555 Huey, B., Hall, J. 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*:

556 Minisatelite probe from bacteriophage M13. Journal of Bacteriology, 171:2528-

557 2532.

558

559 Ikeda, S., Okubo, T., Anda, M., Nakashita, H., Yasuda, M., Sato, S., Kaneko, T.,

560 Tabata, S., Eda, S., Momiyama, A., Terasawa, k., Mitsui, H., Minamisawa, K.

561 2010. Community-and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-

562 bacterial interactions in soybeans and rice. Plant and Cell Physiology, v. 51(9),

563 p. 1398-1410.

564

565 Jayashree, S., Vadivukkarasi, P., Anand, K., Kato, Y., Seshadri, S. 2011.

566 Evaluation of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria for phosphate

567 solubilization. Archives of Microbiology, DOI 10.1007/s00203-011-0691-z.

568

569 Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner,

570 A.A., Azevedo, J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated

571 bacteria and their potential for plant growth promotion. Environmental
572 Microbiology, 6:1244-1251.

573

574 Lakshminarayana, K., 1993. Influence of *Azotobacter* on nitrogen nutrition of
575 plants and crop productivity. Proceedings of the Indian National Science
576 Academy B 59, p. 303-308.

577

578 Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A.,
579 McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D.,
580 Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0.
581 Bioinformatics Applications Note, Vol. 23 no. 21, pages 2947–2948.

582

583 Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Applications of free living plant growth
584 promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek 86: p. 1–25.

585

586 Lugtemberg, B. And Kamilova, F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria.
587 Annual Review of Microbiology, 63:541-556.

588

589 Mangin, I., Corroler, D., Reinhardt, A., Gueguen, M., 1999. Genetic diversity
590 among dairy *lactococcal* strains investigated by polymerase chain reaction with
591 three arbitrary primers. Journal of Applied Microbiology, 86, 514-520.

592

593 Masirevic, S., Gulya, T.J., 1992. Sclerotinia and Phomopsis -two devastating
594 sunflower pathogens. Field Crops Research, v.30, p.271-300.

595

- 596 Mathre, D.E., Cook, R.J., Callan, N.W., 1999. From discovery to use:
597 Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease
598 control. *Plant Disease*, v. 83, pp. 972-983.
599
- 600 Mavingui, P., Laguerre, G., Berge, O., Heulin, T. 1992. Genetic and phenotypic
601 diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Applied and*
602 *Environmental Microbiology*, 58:1894-1903.
603
- 604 Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R., Verma, D., 2000.
605 Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils.
606 *FEMS Microbiology Letters* 182:291–296.
607
- 608 Piceno, Y.M., Noble, P.A., Lovell, C.R., 1999. Spatial and temporal assessment
609 of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using
610 denaturing gradient gel eletrophoresis analysis. *Microbial Ecology*. 38: 157-167.
611
- 612 Rodrigues, E.P., Rodrigues, L.S., Oliveira, A.L.M., Baldani, V.L.D., Teixeira,
613 K.R.S., Urquiaga, S., Reis, V.M. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation:
614 effects on growth, yield and N₂ fixation of rice. *Plant and Soil*, 302:249-261.
615
- 616 Roesch, L.F.W., Quadros, P.D., Camargo, F.A.O., Triplett, E.W., 2007.
617 Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and
618 auxin production in multiple field sites in southern Brazil. *World Journal of*
619 *Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1377-1383.
620

621 Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic
622 inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.

623

624 Rösch, C., Bothe, H., 2005. Improved Assessment of Denitrifying, N₂-Fixing,
625 and Total-Community Bacteria by Terminal Restriction Fragment Length
626 Polymorphism Analysis Using Multiple Restriction Enzymes Applied and
627 *Environmental Microbiology*, April 2005, p. 2026-2035, Vol. 71.

628

629 Rosenblueth, M. and Martinez Romero, E. 2004. *Rhizobium etli* maize
630 populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of*
631 *Microbiology*, 181:337-344.

632

633 Ryder, M.H., Zhinong, Y., Terrace, T.E., Rovira, R.D., Wenhua, T., Carrell, R.L.,
634 Yan, Z., Tang, W., 1999. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress
635 take-all and *Rhizoctonia* root rot, and promote seedling growth of glasshouse
636 grown wheat in Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry* 31:19_ 29.

637

638 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory*
639 *Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold. Spring Harbor, NY.

640

641 Schauer, S. and Kutschera, U. 2008. Methylophilic bacteria on the surfaces of
642 field-grown sunflower plants: a biogeographic perspective. *Theory in*
643 *Biosciences*, 127:23-29.

644

645 Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987, Universal chemical assay for the detection
646 and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160, 47–56.

647

648 Surette, M.A., Sturz, A.V., Lada, R.R., Nowak, J. 2003. Bacterial endophytes in
649 processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population
650 density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant and Soil*, 253:381

651 390.

652

653 Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant
654 and Soil* 255: 571–586.

655

656 Vogt, G.A., Balbinot Júnior, A.A., Souza, A.M. 2010. Divergência genética entre
657 cultivares de girassol no planalto norte de Santa Catarina. *Scientia Agraria*,
658 11:307-315.

659

660 Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. 2007. Naive Bayesian
661 Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial
662 Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5261-5267.

663

664 Xie, G.H., Cui, Z., Yu, J., Yan, J., Hai, W., Steinberger, Y. 2006 Identification of
665 *nif* genes in N₂-fixing bacterial strains isolated from rice fields along the Yangtze
666 River Plain. *Journal of Basic Microbiology*, 46:56–63.

667

668 Table 1. Culturable bacterial community and number of isolates of each colony
669 morphology colonizing different tissues in two sunflower genotypes. Counts are
670 the means of three replicates.

672 Table 2. Characteristics of the bacterial strains isolated from different tissues and the
673 rhizosphere of two sunflower cultivars and characterization of the plant growthpromotion
674 potential. The accession numbers of 16S rRNA gene sequences deposited in GenBank
675 are presented. The most probable species to which each strain belongs was determined
676 by homology with the partial sequence of the 16S rRNA gene and Bayesian
677 phylogenetic inference.

678

679

680 ¹Isolate codes adopted; ²Isolates obtained from stems, roots and florets were
681 considered endophytes; ³Biological nitrogen fixation (BNF) potential determined
682 by ability to consecutively grow on Nfb N-free semi-solid medium; ⁴Antagonistic
683 activity was determined in vitro against *Sclerotinia sclerotiorum*; ⁵Phosphate
684 solubilization potential was determined in vitro by the ability to solubilize
685 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in NBRIP solid medium; ⁶Total indoles in the supernatant of isolates
686 cultured in Dygs liquid medium supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DL-tryptophan;
687 ⁷Siderophore production determined in Dygs solid medium supplemented with
688 chrome azurol S; ⁸Accession numbers of the partial 16S rRNA gene deposited in
689 GenBank; ⁹Probable species to which the isolate belongs, as determined by
690 Bayesian phylogenetic analysis; ¹⁰ND -not detected; ¹¹NS -not sequenced;
691 *Probable species to which the isolate belongs, as determined by clonal
692 relationship based on RAPD profile.

693

694

695 Table 3. Bacterial strains with high potential for plant growth-promotion (PGP) of
696 the sunflower based on specific traits.

697

698

699 *Strains with the highest recorded value for each trait studied; Underlined
700 strains are those which presented more than 1 high-potential plant growth
701 promotion trait.

702

703

704 Table 4. Distribution of the bacterial strains sequenced on different plant tissues

705 and rhizospheres of two sunflower genotypes.

706

707

708 ¹Bacterial strains identified according to the Bayesian tree constructed using

709 *Bacillus* type strains.

710 ²Rhizosphere strains

711

712

713 Figure 1. Bayesian cladistic tree constructed using the 16S rRNA gene
714 sequences of *Bacillus* sp. type strains and sequences of *Bacillus* isolates
715 obtained in this study. Bootstrap confidence levels greater than 50% are
716 indicated at the internodes.

717

718 Figure 2. Bayesian cladistic tree constructed with the 16S rRNA sequences of
719 *Methylobacterium* sp. type strains and sequences of *Methylobacterium* isolates
720 obtained in this study. Bootstrap confidence levels greater than 50% are
721 indicated at the internodes.

723 Figure 3 – UPGMA dendrogram based on Jaccard's coefficient from the RAPD
724 profiles of bacterial isolates colonizing different tissues of two sunflower
725 genotypes. Bacterial strains isolated from Hélio 251 genotype; . Bacterial
726 strains isolated from Aguará 3 genotype.

727

Table

Table 1. Culturable bacterial community and number of isolates of each colony morphology colonizing different tissues in two sunflower genotypes. Counts are the means of three replicates.

	Sunflower hybrid Aguará 3		Sunflower hybrid Hélio 251	
	Number of isolates	Log CFU g ⁻¹	Number of isolates	Log CFU g ⁻¹
Rhizosphere	3	6.95	15	6.73
Roots	3	6.23	10	5.51
Stem	9	5.39	5	5.47
Florets	8	4.36	4	4.74
Total of isolates	23		34	

Table

Table 2. Characteristics of the bacterial strains isolated from different tissues and the rhizosphere of two sunflower cultivars and characterization of the plant growth-promotion potential. The accession numbers of 16S rRNA gene sequences deposited in GenBank are presented. The most probable species to which each strain belongs was determined by homology with the partial sequence of the 16S rRNA gene and Bayesian phylogenetic inference.

Isolate ¹	Sunflower genotype	Sampling region ²	BNF ³	Antagonist Activity ⁴	Phosphate solubilization ⁵	Indolic compounds ⁶	Siderophore production ⁷	GenBank ID ⁸	Probable species ⁹
CA	Hélio 251	Stem	No	<1.0	ND ¹⁰	986.93	ND	HM061667	<i>Bacillus</i> sp.
CB	Hélio 251	Stem	No	<1.0	ND	979.82	2.67	HM061673	<i>B. amyloliquefaciens</i>
CC	Aguará 3	Stem	No	1.2	ND	1148.43	2.48	HM061679	<i>B. cereus</i>
CD	Aguará 3	Stem	No	<1.0	ND	874.13	ND	HM061684	<i>B. cereus</i>
CE	Aguará 3	Stem	No	<1.0	ND	297.27	ND	HM061689	<i>Bacillus</i> sp.
CF	Aguará 3	Stem	No	<1.0	3.28	310.74	1.85	HM061650	<i>B. cereus</i>
CG	Hélio 251	Stem	No	<1.0	ND	369.83	ND	HM061651	<i>B. megaterium</i>
CH	Aguará 3	Stem	Yes	<1.0	ND	265.73	ND	HM061656	<i>B. cereus</i>
CI	Aguará 3	Stem	No	1.6	ND	212.29	ND	HM061657	<i>B. megaterium</i>
CJ	Aguará 3	Stem	No	<1.0	ND	416.39	2.23	HM061662	<i>B. subtilis</i>
CK	Hélio 251	Stem	No	<1.0	ND	117.53	ND	HM061674	<i>B. cereus</i>
CL	Hélio 251	Stem	No	<1.0	1.57	319.88	2.23	HM061668	<i>B. cereus</i>
CM	Aguará 3	Stem	No	1.9	2.97	1641.16	1.37	NS ¹¹	<i>Bacillus</i> sp.
CN	Aguará 3	Stem	No	<1.0	ND	821.97	ND	NS	<i>Bacillus</i> sp.
RA	Hélio 251	Roots	No	<1.0	ND	953.61	ND	HM061691	<i>B. megaterium</i>
RB	Hélio 251	Roots	No	<1.0	ND	100.73	ND	HM061652	<i>B. thuringiensis</i>
RC	Aguará 3	Roots	No	<1.0	2.72	288.80	1.53	HM061658	<i>B. megaterium</i>
RD	Hélio 251	Roots	No	<1.0	ND	102.00	1.42	HM061664	<i>B. megaterium</i>
RE	Hélio 251	Roots	No	<1.0	ND	160.87	2.08	HM061670	<i>B. megaterium</i>

Table 2. Continuation.

RF	Hélio 251	Roots	No	<1.0	ND	111.41	5.25	HM061676	<i>B. thuringiensis</i>
RG	Aguará 3	Roots	No	<1.0	ND	260.27	1.76	HM061681	<i>B. megaterium</i>
RI	Aguará 3	Roots	No	1.6	ND	477.02	ND	HM061686	<i>B. pumilus</i>
RJ	Hélio 251	Roots	No	<1.0	ND	141.63	ND	HM061692	<i>Bacillus</i> sp.
RK	Hélio 251	Roots	No	<1.0	1.36	109.26	ND	HM061653	<i>B. cereus</i>
RM	Hélio 251	Roots	No	<1.0	1.47	122.46	2.78	HM061659	<i>B. megaterium</i>
RN	Hélio 251	Roots	No	<1.0	1.25	115.41	1.77	HM061665	<i>B. cereus</i>
RO	Hélio 251	Roots	No	<1.0	ND	141.60	4.67	HM061671	<i>B. megaterium</i>
T1AG	Aguará 3	Florets	Yes	<1.0	ND	173.76	2.58	HM061682	<i>B. pumilus</i>
T1AH	Aguará 3	Florets	No	<1.0	ND	481.50	3.83	NS	<i>Bacillus</i> sp.
T2AF	Aguará 3	Florets	No	<1.0	ND	190.67	3.70	HM061690	<i>B. amyloliquefaciens</i>
T2AJ	Aguará 3	Florets	No	<1.0	ND	368.28	ND	HM061663	<i>B. cereus</i>
T2AK	Aguará 3	Florets	No	<1.0	ND	218.20	3.67	NS	<i>Bacillus</i> sp.
T3AL	Aguará 3	Florets	No	1.5	1.57	165.83	2.13	NS	<i>B. thuringiensis</i> *
T4AE	Hélio 251	Florets	No	1.1	ND	136.46	2.79	HM061675	<i>B. thuringiensis</i>
T4AL	Aguará 3	Florets	No	1.5	ND	250.71	3.08	HM061669	<i>B. thuringiensis</i>
T5AL	Aguará 3	Florets	No	<1.0	ND	327.59	ND	NS	<i>B. pumilus</i> *
TSAA	Hélio 251	Florets	No	<1.0	ND	750.60	1.90	HM061680	<i>M. komagatae</i>
TSAB	Hélio 251	Florets	No	1.8	1.50	128.94	ND	HM061685	<i>B. amyloliquefaciens</i>
TSAD	Hélio 251	Florets	No	<1.0	2.97	447.32	1.19	NS	<i>Bacillus</i> sp.
ZA	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	3.89	381.62	1.15	HM061648	<i>B. amyloliquefaciens</i>
ZB	Aguará 3	Rhizosphere	No	<1.0	ND	347.18	ND	HM061654	<i>Bacillus</i> sp.
ZC	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	641.40	1.49	NS	<i>B. amyloliquefaciens</i> *
ZD	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	610.10	ND	HM061672	<i>B. amyloliquefaciens</i>
ZE	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	ND	ND	HM061678	<i>B. pumilus</i>
ZF	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	ND	ND	HM061683	<i>B. pumilus</i>
ZG	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	110.76	3.50	HM061688	<i>Bacillus</i> sp.
ZH	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	ND	ND	NS	<i>Bacillus</i> sp.
ZI	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	ND	ND	HM061649	<i>Bacillus</i> sp.
ZJ	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	2.50	93.34	2.35	HM061655	<i>Bacillus</i> sp.

Table 2. Continuation.

ZK	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	130.47	5.17	NS	<i>B. pumilus</i> [*]
ZL	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	ND	2.88	NS	<i>Bacillus</i> sp.
ZM	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	1254.62	ND	HM061687	<i>M. komagatae</i>
ZO	Aguará 3	Rhizosphere	No	<1.0	ND	266.00	1.63	HM061680	<i>B. megaterium</i>
ZQ	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	879.23	ND	HM061686	<i>M. komagatae</i>
ZR	Hélio 251	Rhizosphere	Yes	<1.0	ND	362.24	3.40	HM061681	<i>B. megaterium</i>
ZS	Hélio 251	Rhizosphere	No	<1.0	ND	279.51	2.26	NS	<i>Bacillus</i> sp.
RP	Aguará 3	Rhizosphere	No	<1.0	ND	1653.37	ND	HM061677	<i>B. cereus</i>

¹Isolate codes adopted; ²Isolates obtained from stems, roots and florets were considered endophytes; ³Biological nitrogen fixation (BNF) potential determined by ability to consecutively grow on NFB N-free semi-solid medium; ⁴Antagonistic activity was determined *in vitro* against *Sclerotinia sclerotiorum*; ⁵Phosphate solubilization potential was determined *in vitro* by the ability to solubilize Ca₃(PO₄)₂ in NBRIP solid medium; ⁶Total indoles in the supernatant of isolates cultured in Dygs liquid medium supplemented with 100 µg/mL DL-tryptophan; ⁷Siderophore production determined in Dygs solid medium supplemented with chrome azurol S; ⁸Accession numbers of the partial 16S rRNA gene deposited in GenBank; ⁹Probable species to which the isolate belongs, as determined by Bayesian phylogenetic analysis; ¹⁰ND - not detected; ¹¹NS - not sequenced; ^{*}Probable species to which the isolate belongs, as determined by clonal relationship based on RAPD profile.

Table

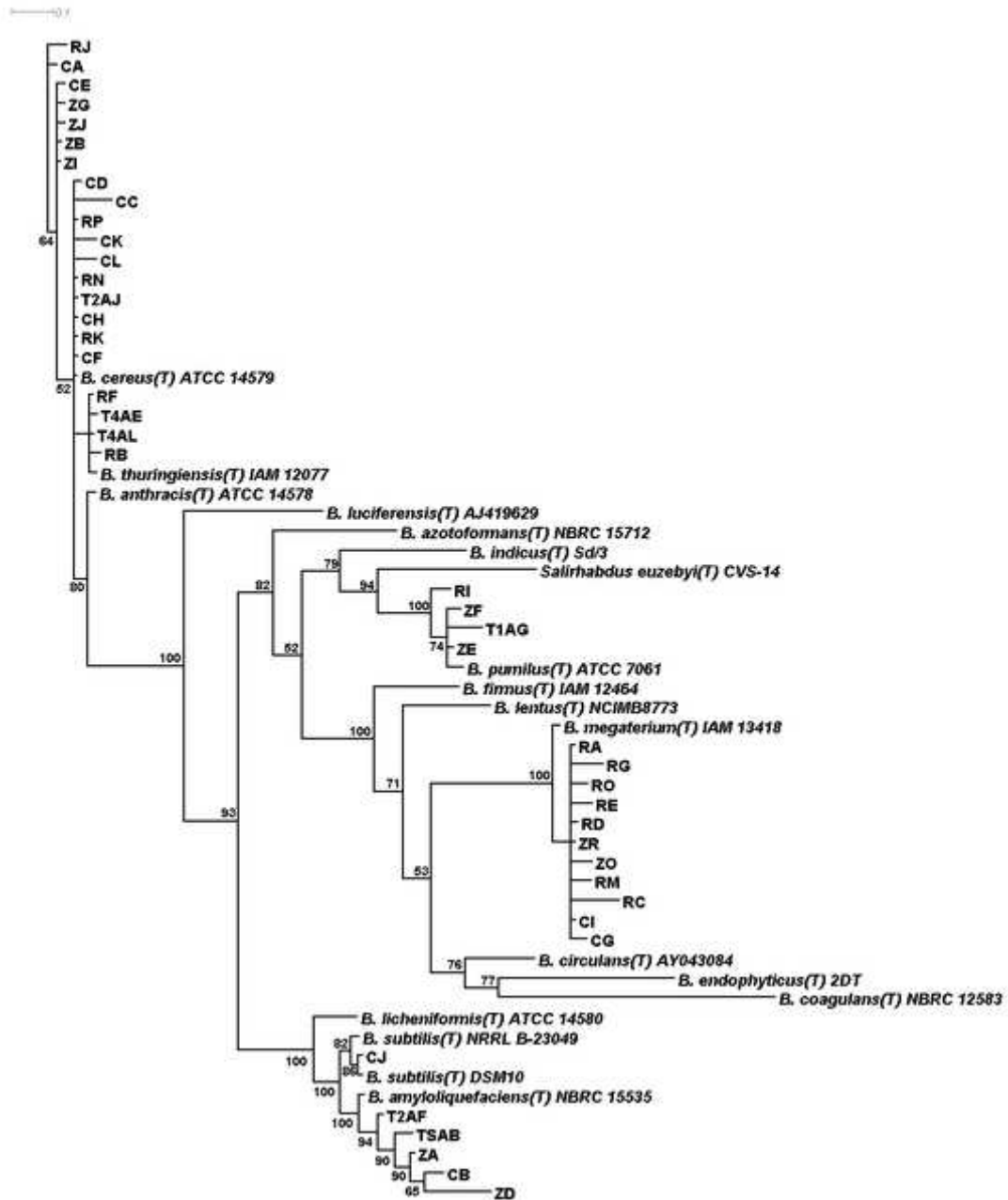
Table 3. Bacterial strains with high potential for plant growth-promotion (PGP) of the sunflower based on specific traits.

PGP trait	Aguará 3	Hélio 251
BNF	CH, <u>T1AG</u>	<u>ZR</u>
Auxin ($\mu\text{M AIA} / \mu\text{g protein}^{-1} \geq 850$)	CC, CD, <u>CM</u> , RP*	CA, <u>CB</u> , RA, ZM, ZQ
Siderophore (SI ≥ 2.5)	<u>T1AG</u> , T1AH, T2AF, T2AK, <u>T4AL</u>	<u>CB</u> , RF*, RM, RO, T4AE, ZG, ZK, ZL, <u>ZR</u>
P-solubilization (PSI ≥ 2.5)	CF, <u>CM</u> , RC	TSAD, ZA*, ZJ
Antagonism (IH ≥ 1.5)	CI, <u>CM*</u> , RI, T3AL, <u>T4AL</u>	TSAB

*Strains with the highest recorded value for each trait studied; Underlined strains are those which presented more than 1 high-potential plant growth-promotion trait.

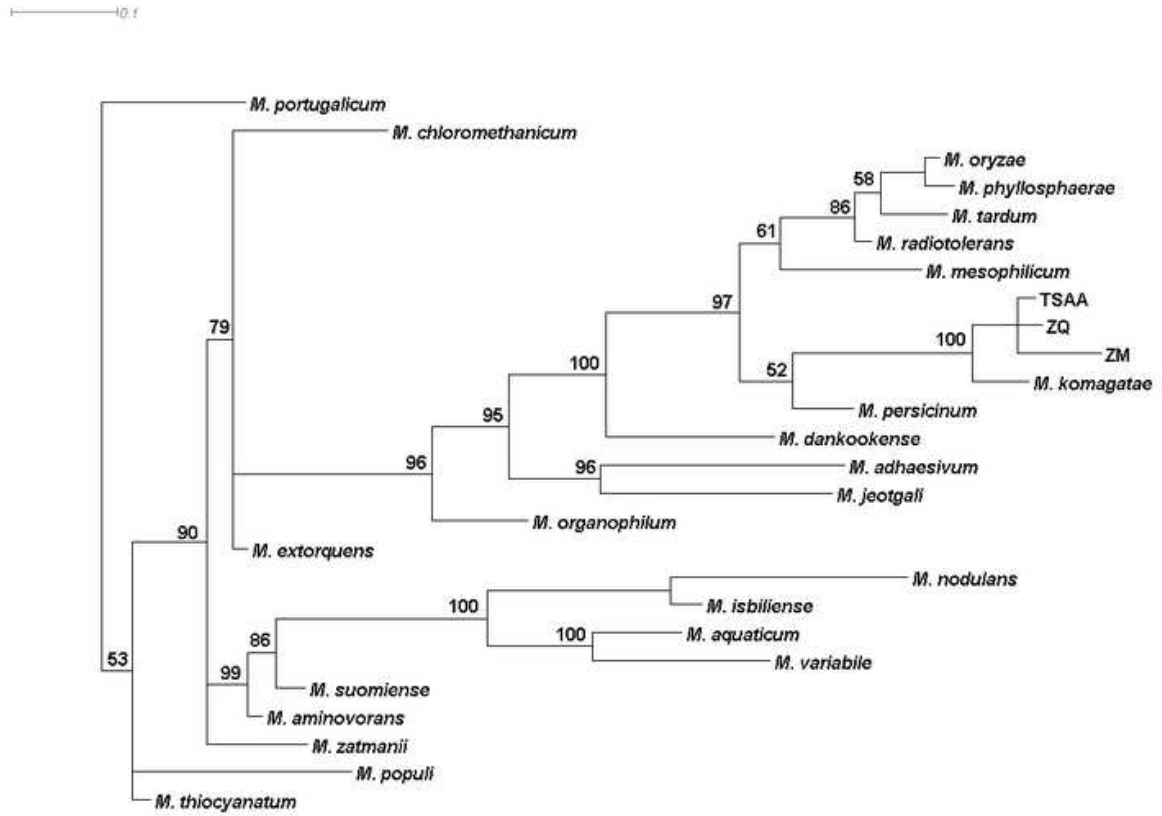
Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Figure

[Click here to download high resolution image](#)

