



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EMILYN EMY MATSUMURA

**ACESSO Á DIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA
TOTAL E METABOLICAMENTE ATIVA EM PLANTAS DE
MILHO**

Londrina
2012

EMILYN EMY MATSUMURA

**ACESSO Á DIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA
TOTAL E METABOLICAMENTE ATIVA EM PLANTAS DE
MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Microbiologia.

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

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M434a Matsumura, Emilyn Emy.
Acesso á diversidade bacteriana endofítica total e metabolicamente ativa
em plantas de milho / Emilyn Emy Matsumura. – Londrina, 2012.
88 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Genética microbiana – Teses. 2. Bactérias endofíticas – Teses. 3. Milho
– Inoculação – Teses. 4. Milho – Desenvolvimento – Teses. 5. Crescimento
(Plantas) – Teses. I. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.25

EMILYN EMY MATSUMURA

**ACESSO Á DIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA TOTAL E
METABOLICAMENTE ATIVA EM PLANTAS DE MILHO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira
UEL – Londrina - PR

Componente da Banca: Marco Antonio Nogueira
Embrapa-Soja - PR

Componente da Banca: Leonardo Magalhães Cruz
UTFPR – Curitiba - PR

Londrina, 27 de abril de 2012.

Aos meus pais, Maria Dognani e Hiroaki Matsumura, pelo amor incondicional e pela forma cuidadosa e carinhosa que apoiaram minha vida acadêmica. Muito obrigada. Eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé, que motiva a busca constante dos meus sonhos e pela paciência, que me faz saber esperar a hora certa deles acontecerem.

Ao meu orientador André Luiz Martinez de Oliveira, por todo apoio, orientação e confiança; pelo bom convívio neste dois anos, pela amizade e, principalmente, por nunca ter desistido e nunca ter me deixado desistir, mesmo nos momentos de maior desânimo.

Ao CNPq (INCT-FBN), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, um exemplo de profissional para mim; que desde antes do meu ingresso ao mestrado, sempre me atendeu com atenção e carinho; e à Profa. Dra. Renata Stolf Moreira, por ter contribuído imensamente com este trabalho, por toda a ajuda, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Emanuel Maltempo de Souza, por ter me recebido no laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular da Universidade Federal de Curitiba para a realização de parte do trabalho; e agradecer com carinho ao técnico do laboratório Valter Antonio de Baura, por toda a ajuda, atenção e paciência.

À Dra. Mariangela Hungria, por ter me recebido no laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa-Soja para a realização de parte do trabalho; e agradecer com carinho ao Renan e ao Juscélio que me ajudaram sempre com muita atenção.

À Profa. Dra. Maria Helena Fungaro, por ter me recebido no laboratório de Genética de Fungos da Universidade Estadual de Londrina para a realização de parte do trabalho; e agradecer com carinho à Lara que me recebeu e me auxiliou no laboratório.

À Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues, à Profa. Dra. Márcia Cristina FuRNAleto e ao Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz por terem aceitado o convite para a banca e por todas as sugestões e contribuições ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Nozawa, coordenador do curso de pós-graduação em Microbiologia, por todas as ajudas nestes dois anos; e agradecer a todos os professores do programa de pós-graduação em Microbiologia, por todos os ensinamentos.

Ao departamento de Bioquímica e Biotecnologia, onde desenvolvi o trabalho nestes dois anos. A todos os professores do departamento e a todos funcionários: Elda, Sérgio e Sandra. Gostaria de agradecer com muito carinho ao técnico dos laboratórios de bioquímica, Nelson Janeiro, por toda a ajuda nestes dois anos, pelos ensinamentos e pela paciência infinita que tem com os alunos; e agradecer de forma muito especial Sílvia Borba,

pela amizade, pelas demonstrações de carinho, pelos conselhos, pelas conversas divertidas, enfim...por ser esse exemplo de ser humano.

A todos os colegas de mestrado, Alane, Bárbara, Carol, Cíntia, Eliandro, Suellen, Renata, Vivian, Nayara, Marco, e em especial à minhas colegas de mestrado e amigas para toda a vida, Priscila e Kátia, obrigada pela a amizade, pelo companheirismo, por darem leveza a essa vida pesada de um mestrando, eu amo vocês.

Aos colegas de laboratório, Kelly, Arthur, Humberto, Danielle, Karita, Carla, Karina, Mariana, Bruna, Jaque, Lucas, Flávia, Tamires, Fabiana; em especial ao Odair e ao Vini que me ajudaram muito nos trabalhos de campo e laboratoriais.

Gostaria de agradecer de forma muito carinhosa aqueles que além de companheiros de laboratórios, foram também companheiros de vida, que dividiram momentos de alegrias e me fizeram rir muito nestes dois anos: Eddie, Mariane, Lu Grade, Ana Eliza, Adriana, Carol, Aline, Leonardo e um carinho especial àqueles que fizeram destes últimos meses difíceis se tornarem os mais divertidos, Patrícia, Thiago e Ismael; e um agradecimento mais que especial a Paulo Marcelino, meu amigo-irmão, que fez dos meu dias os mais divertidos e me faz acreditar cada vez mais na amizade e na verdade, obrigada por tudo meu amigo, eu amo você.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que mesmo de longe, sempre estão torcendo e orando por mim; meus amigos de infância que são os meus tesouros e a todos os amigos que fiz durante o mestrado; agradeço com muito carinho Matheus Vallim, meu eterno amigo e amor, que esteve ao meu lado desde o cursinho até o mestrado, vibrou comigo em todas as conquistas e acompanhou de perto minha vida acadêmica, me dando apoio, carinho e luz para minha vida.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma com o desenvolvimento deste trabalho, e peço desculpas se esqueci de mencionar alguém, muito obrigada!

...quero viver ao lado de gente humana, muito humana;
que sabe rir de seus tropeços...
não se encanta com triunfos...
não se considera eleita antes da hora...
não foge de sua mortalidade...

(O tempo e as jaboticabas – Rubem alves).

MATSUMURA, Emilyn Emy. **Acesso á diversidade bacteriana endofítica total e metabolicamente ativa em plantas de milho.** 2012. 88 f. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Bactérias endofíticas podem promover o crescimento vegetal a partir de vários processos, tais como: produção de fitormônios, fixação do nitrogênio atmosférico e disponibilização de nutrientes para a planta. Diante da atual necessidade de se buscar uma agricultura ecológica e sustentável, é de grande interesse estudar a diversidade dessas bactérias associadas a plantas de importância econômica e alimentar, como o milho, para que seu potencial seja melhor explorado na agricultura. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de grupos dominantes da comunidade bacteriana endofítica associada ao milho, cultivado sob a utilização de fertilizante nitrogenado e inoculação com *Azospirillum brasilense*. O milho foi cultivado sob 8 tratamentos diferentes, combinando-se a aplicação e a não aplicação do fertilizante nitrogenado, com o tipo de inoculação (turfoosa na semente e líquida na pós-emergência). Após 30 dias de cultivo, foram coletadas 3 plantas aleatoriamente de cada tratamento, totalizando 18 amostras. O colmo de todas as amostras foi armazenado a – 20 °C até o seu processamento. A diversidade bacteriana foi avaliada através da análise de bibliotecas de DNA e DNAC, construídas a partir da extração direta de DNA e RNA do colmo do milho, amplificação dos fragmentos do gene 16S RNAr, clonagem e sequenciamento dos fragmentos e comparação das sequências com as informações contidas no banco de dados 16S RNAr do RDP II. Para a biblioteca de DNA, houve predominância dos filos Cyanobacteria e Proteobacteria, com 63 e 37% das sequências, respectivamente, sendo que as cianobactérias foram predominantes nos tratamentos sem inoculação e com inoculação em turfa na semente, e as proteobactérias foram predominantes nos tratamentos com inoculação líquida na pós-emergência da planta, independente se houve ou não aplicação do N. Para a biblioteca de DNAC, verificou-se a predominância do filo Proteobacteria, com 92% das sequências, não apresentando diferenças contrastantes entre os tratamentos. Das duas bibliotecas, os gêneros mais frequentes para o filo Proteobacteria foram *Novosphingobium* e *Sphingomonas*. Desta forma, esses representantes, além de serem predominantes no milho, podem ser considerados metabolicamente ativos na cultura e, juntamente com as cianobactérias, podem apresentar um potencial para a promoção do crescimento da planta de milho.

Palavras-chave: Diversidade bacteriana. Endofíticos. Milho. 16S RNAr. Bibliotecas de DNA e DNAC.

MATSUMURA, Emilyn Emy. **Access to the total endophytic bacterial diversity and metabolically active in maize plants.** 2012. 88. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The endophytic bacteria community are known to comprise species able to promote the plant growth through different processes such as plant hormone production, biological nitrogen fixation and nutrient supply. The necessity to develop ecological and sustainable agriculture is of ultimate importance to assure the food safety for the future generations. In this sense, the study of the bacterial diversity in association with economically important plants as the maize, is of great interest to better explore its potential in agriculture. The aim of this work was to compare and estimate the diversity of the endophytic bacteria community in association with maize grown with (160 kg N ha⁻¹) and without (0 kg N ha⁻¹) N-fertilizer input, and different *Azospirillum* inoculation strategies (peat-based formulation applied over the seeds, and a liquid-based formulation applied at topdressing). After 30 days of cultivation, three plants were collected randomly from each treatment, totaling 18 samples. The stems of all samples was stored at -20 °C until processing. Bacterial diversity was assessed through sequence analysis of DNA and cDNA libraries. Clonal libraries were constructed with 16S rRNA gene fragments amplified from total DNA and RNA extracts obtained from the maize stems, sequenced and compared with sequences available on the web-based databanks to phylogenetic positioning. The comparison of the obtained sequences using the Ribosomal Database Project (RDP) classifier allowed to identify the predominance of the phylum Cyanobacteria and Proteobacteria on the analyzed libraries, which comprised up to 63 % and 37 % of the sequences, respectively. The cyanobacteria predominate on the libraries constructed with nucleic acid extracts originated from the treatments without inoculation and from the treatments inoculated with the peat-based formulation. Proteobacteria was the predominant phylum on the libraries constructed with nucleic acid extracts originated from the plants inoculated with the liquid-based formulation, regardless whether or not the N-fertilizer was applied. For the cDNA library, a predominance of the phylum Proteobacteria, with 92% of the sequences was found, with no significant differences between the treatments. Considering both libraries, the most commonly found genera of the phylum Proteobacteria were *Novosphingobium* and *Sphingomonas*. Thus, it is suggested that these bacteria genera represents the predominant endophytic bacteria in maize, been considered metabolically active inside the plant, and together with the cyanobacteria can present potential to promote the growth of corn plant.

Keywords: Bacterial diversity. Endophytes. Corn. 16S rRNA. DNA and cDNA libraries.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem referente à área da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, no município de Londrina, PR. A seta indica o local onde foi instalado o experimento de campo do presente trabalho 36
- Figura 2** - Perfil eletroforético de 24 amostras de DNA extraídas do colmo do milho (seta vermelha). Canaletas a – x: amostras de DNA total extraído da parte inteRNA de colmos de plantas de milho com 30 dias de plantio. Canaletas 1 – 4: padrões quantitativos para DNA contendo concentrações crescentes de fago λ (Invitrogen); 1) 20 ng DNA μL^{-1} ; 2) 40 ng DNA μL^{-1} ; 3) 86 ng DNA μL^{-1} ; 4) 185 ng DNA μL^{-1} 49
- Figura 3** - Perfil eletroforético de 10 amostras de RNA total extraídas diretamente do colmo de milho. As setas vermelhas indicam as subunidades ribossomais 23S e 16S. Canaletas: a-j: amostras de RNA total extraídas diretamente do colmo de milho 50
- Figura 4** - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das amostras de DNA, amplificadas com os iniciadores 27f/1492r (Figura 4A) e 27f/518r (Figura 4B). Canaletas a-j (Figura 4A): produtos de PCR das amostras de DNA, amplificadas com os iniciadores 27f/1492r. Canaletas a-h (Figura 4B): produtos de PCR das amostras de DNA, amplificadas com os iniciadores 27f/518r 51
- Figura 5** - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das amostras de DNAC, amplificadas com os iniciadores 27f/778r (700 pb, aproximadamente). Canaletas a-d: produtos de PCR das amostras de DNAC, amplificadas com os iniciadores 27f/778r 51
- Figura 6** - Análise em gel de agarose 1 % do miniprep de clones aleatórios da biblioteca de DNAC (6A) e DNA (6B), digeridos pela enzima EcoRI 54
- Figura 7** - Filograma das sequências de 16S DNAr, amplificadas da biblioteca de DNA, indicando o nome completo das bactérias encontradas e o último nível taxonômico encontrado. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições. Todas as sequências obtidas dos clones foram enumeradas (1 a 288). Os tratamentos foram indicados conforme a legenda da Figura. A abreviatura foi designada como Uncult., Uncultured 57
- Figura 8** - Filograma das sequências de 16S DNAr, amplificadas da biblioteca de DNAC, indicando o nome completo das bactérias encontradas e o último nível taxonômico encontrado. O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições. Todas as sequências obtidas dos clones foram enumeradas (1 a 83). Os tratamentos foram indicados conforme a legenda da Figura. A abreviatura foi designada como Uncult., Uncultured 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Evolução da produção mundial e brasileira do milho de 2002 a 2012 em milhões de toneladas.....	18
Tabela 2 – Exemplos de bactérias endofíticas e seus respectivos hospedeiros.....	25
Tabela 3 - Análise química do solo da área experimental.....	37
Tabela 4 - Combinação dos tratamentos utilizados para o cultivo do milho.....	38
Tabela 5 - Iniciadores utilizados para as reações de amplificação do gene 16S RNAr.....	42
Tabela 6 - Número de clones encontrados em cada tratamento na biblioteca de DNA. *Tratamentos: A0I0: sem aplicação de N e sem inoculação; A2I0: com 160 Kg ha ⁻¹ de N aplicado e sem inoculação; A0I1: sem aplicação de N e inoculação em turfa na semente; A2I1: com 160 Kg ha ⁻¹ de N aplicado e inoculação em turfa na semente; A0I3: sem aplicação de N e inoculação líquida na pós-emergência e A2I3: com 160 Kg ha ⁻¹ de N aplicado e inoculação líquida na pós-emergência.....	52
Tabela 7 - Produtividade do milho em Mg ha ⁻¹ para os diferentes tratamentos.....	58
Tabela 8 - Número de clones encontrados em cada tratamento na biblioteca de DNAc. *Tratamentos: A0I3: sem aplicação de N e inoculação líquida na pós-emergência e A2I3: com 160 Kg ha ⁻¹ de N aplicado e inoculação líquida na pós-emergência.....	59
Tabela 9 - Resultado da comparação das sequências parciais da biblioteca de 16S DNAr com o banco de dados do RDP II pelo programa <i>Classifier</i> , com índice de confiança variável entre 97 a 100 % e <i>Sequence Match</i>	79
Tabela 10 - Resultado da comparação das sequências parciais da biblioteca de 16S DNAr da biblioteca de DNAc com o banco de dados do RDP II pelo programa <i>Classifier</i> , com índice de confiança variável entre 97 a 100 % e <i>Sequence Match</i>	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	INTERAÇÃO ENTRE PLANTAS E MICRO-ORGANISMOS	16
2.2	BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E SUA APLICAÇÃO NA AGRICULTURA	17
2.3	A IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO	24
2.3.1	Importância do Nitrogênio Para a Cultura de Milho	26
2.3.2	O Uso de Inoculantes na Cultura de Milho	28
2.3.3	Bactérias Endofíticas Associadas ao Milho.....	29
2.4	A DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	31
2.4.1	Técnicas Moleculares na Análise de Bactérias Endofíticas	32
3	OBJETIVO GERAL	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	EXPERIMENTO DE CAMPO.....	36
4.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	38
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA E RNA.....	39
4.3.1	Extração de DNA Total.	39
4.3.2	Extração de RNA Total.	39
4.3.3	Quantificação dos Extratos de DNA E RNA.....	40
4.3.4	Trascrição Reversa.....	41
4.4	AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL 16S DAS AMOSTRAS DE DNA E DNAC	41
4.4.1	Purificação dos Produtos Amplificados.....	43
4.5	CLONAGEM.....	43
4.5.1	Reação de Ligação	44
4.5.2	Obtenção de Células Competentes	44
4.5.3	Transformação das Células Competentes.....	45
4.5.4	Crescimento e Estoque dos Clones.....	45
4.6	SEQUENCIAMENTO.....	46
4.6.1	Extração de DNA Plasmidial.....	46

4.6.2	Restrição e Quantificação do DNA Plasmidial	46
4.6.3	PCR Para Sequenciamento	47
4.6.4	Precipitação das Reações de Sequenciamento.....	47
4.6.5	Sequenciamento.....	48
4.7	Análise das Sequências.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DO COLMO DE MILHO	49
5.2	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE COLMO DE MILHO	50
5.3	AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RNAR DAS AMOSTRAS DE DNA E DNAC	50
5.4	CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE DNA E DNAC	51
5.5	SEQUENCIAMENTO.....	52
5.5.1	Análise das Sequências da Biblioteca de DNA	53
5.5.2	Análise das Sequências da Biblioteca de DNAC	59
5.5.3	Comparação dos Resultados Obtidos na Biblioteca de DNAC com a Biblioteca de DNA.	61
6	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICES	78
	APÊNDICE A	79

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, os sistemas agrícolas têm sofrido algumas alterações em decorrência dos fortes impactos sociais e ambientais provocados pelos modelos de desenvolvimento agrícola (MACHADO et al., 2008). Na década de 70, com o objetivo de aumentar a produção de alimentos, a agricultura brasileira incorporou o modelo de produção agrícola intensivo baseado no uso de insumos e tecnologia, denominado de Revolução Verde (EMBRAPA, 2003). Este modelo permitiu um grande avanço na produtividade do agronegócio brasileiro em consequência do maior uso de máquinas, insumos e sementes selecionadas, tornando o setor agrícola de extrema importância para o posicionamento do Brasil dentro do cenário econômico internacional (SHIVA, 2003). Por outro lado, a adoção de variedades altamente responsivas aos fertilizantes, plantadas em extensas áreas de monocultura, levou ao uso intensivo e crescente de pesticidas e fertilizantes químicos (DAWE, 2000). As consequências disso vêm surgindo sob diversas formas, como: surgimento de novas pragas e doenças e o aparecimento de pragas e patógenos resistentes aos agroquímicos, a perda acelerada da biodiversidade, a contaminação dos solos e das águas, o aumento dos desmatamentos e queimadas para a expansão da fronteira agrícola, o êxodo de populações rurais e a desestruturação de arranjos produtivos locais. A esses efeitos se somam a insegurança alimentar e o uso inadequado dos recursos naturais, a escassez de recursos hídricos, a erosão dos solos e a emissão de gases de efeito estufa (MACHADO et al., 2008).

Diante disso, existe a necessidade de se buscar uma agricultura baseada em princípios ecológicos e sustentáveis. Surgiram propostas de práticas alternativas, baseadas na redução do uso de fertilizantes químicos e na conservação do solo (ALBERGONI e PELAEZ, 2007). Neste contexto, o emprego de micro-organismos promotores de crescimento vegetal como prática agrícola tem aumentado substancialmente nos últimos anos. Estes micro-organismos atuam como substitutos de produtos químicos e favorecem, desta maneira, a preservação do ambiente; além de manter e/ou aumentar a produtividade agrícola em paralelo à diminuição dos custos de produção (PEIXOTO NETO et al., 2002).

As plantas são consideradas um complexo micro-ecossistema composto por diferentes habitats e podem ser colonizadas simultaneamente por grande diversidade de bactérias (CHELIUS e TRIPLETT, 2001; LODWYCKX et al., 2002). Neste aspecto, as bactérias são habitantes comuns da superfície (bactérias epifíticas) e do interior (bactérias endofíticas) da maioria dos vegetais, podendo apresentar relações negativas, neutras e positivas com a planta hospedeira (SOBRAL, 2003). Ultimamente, tem sido dada atenção ao

estudo de bactérias endofíticas, que podem atuar no controle biológico de inúmeras doenças, na promoção de crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997) e na biorremediação de áreas poluídas (NEWMAN e REYNOLDS, 2005), além da produção de fitormônios, fixação do nitrogênio atmosférico e disponibilização de nutrientes para a planta (SOBRAL, 2003). A preferência pelos endofíticos se deve, principalmente, pelo fato destes já serem adaptados ao hospedeiro, apresentando maior capacidade de colonização e menor competição por nutrientes se comparados aos micro-organismos epifíticos (ENEBAK et al., 1998; KHALID et al., 2004). Diante disso, é de grande interesse estudar a diversidade de bactérias endofíticas associadas às plantas de importância econômica e alimentar, como o milho, para que seu potencial seja melhor explorado na agricultura.

Embora tenha havido avanços significativos no entendimento da diversidade das comunidades microbianas, o conhecimento sobre a estrutura e a função dos micro-organismos associados às plantas agrícolas tropicais ainda é incipiente. Essa limitação é, em parte, devido às dificuldades metodológicas na identificação dos micro-organismos e da incapacidade de se isolar populações representativas do ambiente (ROESCH, 2007; OLIVEIRA et al., 2009). Dados derivados de estudos comparativos indicam que apenas uma pequena fração (<1%) dos micro-organismos é cultivada por métodos baseados em cultivo (ROZSAK e COWELL, 1987; PACE, 1997). Como alternativa para esses métodos, técnicas utilizando-se ferramentas moleculares, para os estudos da diversidade microbiana em diferentes ambientes, têm sido desenvolvidas, o que possibilitou a descoberta de novos micro-organismos, até então desconhecidos (PEREIRA, 2003). Entre elas, a análise do gene 16S do RNA ribossomal (RNAr) tem sido considerada uma ferramenta poderosa para investigar a diversidade microbiana de amostras ambientais (HEAD, 1998).

O gene 16S RNAr está universalmente distribuído entre os diferentes grupos de seres vivos e apresenta características conservativas ao longo da evolução, o que gera informações úteis para inferências filogenéticas (REIS JUNIOR et al., 2002; PEREIRA, 2003). Desta forma, pelos métodos moleculares, é possível conhecer e caracterizar as espécies de bactérias endofíticas associadas a qualquer espécie vegetal, como o milho, sem a necessidade das etapas de isolamento e cultivo. Este tipo de abordagem fornece subsídios para o enriquecimento das informações dessa interação, contribuindo assim, para o desenvolvimento de estratégias de manejo que beneficiem o aumento da produção das culturas (IKEDA, 2010).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo analisar a diversidade de grupos dominantes da comunidade bacteriana endofítica associada ao milho, cultivado sob

diferentes tratamentos e, avaliar o impacto da utilização de fertilizante nitrogenado e da inoculação do *Azospirillum brasilense* sobre a diversidade da comunidade bacteriana em associação com o milho. A diversidade bacteriana foi avaliada através da análise de bibliotecas de DNA e DNAc, construídas a partir da extração direta de DNA e RNA do colmo de plantas de milho, amplificação dos fragmentos do gene 16S RNAr, clonagem e sequenciamento dos fragmentos, e comparação das sequências com as informações contidas no banco de dados. Desta maneira, esse estudo se torna importante para ilustrar o impacto da adubação nitrogenada e da inoculação de *Azospirillum brasilense* sobre a comunidade bacteriana endofítica de plantas de milho, fornecendo subsídios para que o potencial destes micro-organismos seja melhor explorado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTERAÇÃO ENTRE PLANTAS E MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos representam uma das maiores fontes de diversidade genética entre os seres vivos. No entanto, essa diversidade ainda se encontra pouco descrita e explorada. Esta microbiota compreende organismos nos três domínios filogenéticos atualmente considerados (Archaea, Bacteria e Eucarya), predominando, em número de espécies descritas, as Eubactérias. Devido à sua longa história evolutiva, os micro-organismos ocupam os mais diferentes nichos da biosfera, e são responsáveis por muitos dos processos essenciais para a manutenção da vida nas condições ambientais atuais (FIGUEIREDO et al., 2008).

Um dos maiores desafios das próximas décadas é o entendimento da ação dos micro-organismos sobre os diferentes ecossistemas, em particular sobre o sistema solo-planta. Praticamente todas as plantas vivem em associação com micro-organismos que podem colonizar sua superfície (colonização epifítica) ou ocupar espaços inter e intracelulares (colonização endofítica) de tecidos vegetais (REIS, 2005). Mesmo em um ambiente dito hostil, como a superfície foliar, exposta a rápidas e frequentes mudanças de temperatura, umidade, radiação UV, entre outras, uma diversa comunidade de micro-organismos pode habitar este nicho, como bactérias, fungos filamentosos, algas, e, menos frequentemente, protozoários e nematóides (ANDREWS e HARRIS, 2000).

Baseado nas suas interações com as plantas, REIS (2005) classificou os micro-organismos como patogênicos, saprófitos e benéficos. Os patógenos atacam tecidos vivos de folhas, colmos ou raízes; já os saprófitos vivem em tecidos mortos e são importantes na ciclagem de nutrientes. Os micro-organismos ditos benéficos apresentam influência positiva sobre o desenvolvimento vegetal, e podem ser usados como inoculantes, sendo classificados de acordo com a sua aplicação: biofertilizantes (como os rizóbios), fitoestimuladores (auxinas produzidas por *Azospirillum* sp.), rizoremediadores (ex: *Pseudomonas*) e biopesticidas (ex: *Bacillus thuringiensis*). Além desta, os micro-organismos também podem ser classificados quanto ao grau de associação com as plantas: micro-organismos de vida livre, que ocorrem preferencialmente no solo e eventualmente associam-se a plantas cultivadas; micro-organismos associativos, que possuem preferência por colonizar ambientes influenciados pelas plantas, como a rizosfera e a filosfera; e micro-organismos endofíticos, que são os que vivem em associação íntima com a planta hospedeira, colonizando

o interior dos seus tecidos sem provocar sintomas de patogenicidade (VESSEY, 2003). É preciso destacar que esta classificação não é absoluta, uma vez que estes habitats (solo, rizosfera e tecidos vegetais internos) não possuem uma fronteira estrita, o que permite o trânsito relativo de micro-organismos entre estes habitats.

Tem havido crescente interesse nos estudos sobre a ocorrência, o potencial de colonização e a utilização de bactérias endofíticas para promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas (HALLMANN et al., 1997; AMORIM e MELO, 2002; SHIOMI et al., 2008). As pesquisas indicam que as bactérias endofíticas não estão sujeitas à competição por nutrientes como normalmente ocorre na rizosfera, e têm maior eficiência do que bactérias colonizadoras da rizosfera na expressão de efeitos como a promoção do crescimento, absorção de água e na supressão de micro-organismos deletérios (AMORIM e MELO, 2002; SANTOS et al., 2005). Alguns autores enfatizam a necessidade da utilização de isolados residentes ou adaptados ao hospedeiro, pela maior capacidade de colonização e menor risco de introdução de organismos exógenos (ENEBAK et al., 1998; KHALID et al., 2004).

2.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E SUA APLICAÇÃO NA AGRICULTURA

Os micro-organismos endofíticos foram descritos pela primeira vez por BARY (1866), citado por PEIXOTO NETO et al. (2002), mas por mais de meio século estes micro-organismos foram ignorados. Contudo, nos anos 70 do século XX, vários estudos demonstraram a interação mutualística entre endófitos e plantas. A partir de então, começou-se a avaliar qual o papel biológico exercido por estes micro-organismos, visando sua aplicação como insumo biotecnológico.

Endofíticos, ou endófitos, são classicamente conceituados como sendo aqueles micro-organismos capazes de colonizar tecidos vegetais em alguma fase do seu ciclo de vida, sem causar danos à planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997).

As bactérias endofíticas têm sido isoladas de raízes, nódulos, caules, folhas e frutos em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como, cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988), milho (FISHER et al., 1992; MCLNROY e KLOEPPER, 1995; ARAÚJO et al., 2000), arroz (STOLZFUS et al., 1997), trigo e sorgo (ZINNIEL et al., 2002), entre outras. Estes micro-organismos endofíticos entram na planta, primeiramente, através das raízes; entretanto, as partes aéreas, como flores, caules e cotilédones podem também ser sítios de colonização. Dentro da planta, essas

bactérias podem se estabelecer no ponto de infecção ou se dispersar de forma sistêmica (HALLMANN et al., 1998; ZINNIEL et al., 2002). A capacidade de colonização de tecidos por estes organismos endofíticos apresenta-se relacionada a diversos fatores, sendo o principal a interação entre os genótipos do vegetal e dos micro-organismos (SCHLOTTER et al., 1994; DONG et al., 1995; RUPPEL et al., 1992; WIEHE et al., 1994; MAHAFFEE et al., 1997). Bactérias endofíticas parecem penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas como celulases e pectinases, além de usarem aberturas naturais ou provocadas por injúrias (QUADT-HALLMANN et al., 1997). O modo de dispersão das bactérias endofíticas pode ser via sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou por meio de insetos (BALDANI, 1997).

Segundo LODEWYCKX et al., (2002), bactérias endofíticas podem ser encontradas tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas, sendo que já foram encontrados mais de 80 gêneros bacterianos colonizando o interior dos tecidos de plantas. ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO (2006) fizeram uma revisão associando as principais bactérias endofíticas com suas respectivas plantas hospedeiras (Tabela 1).

Tabela 1 – Exemplos de bactérias endofíticas e seus respectivos hospedeiros.

Bactérias endofíticas	Planta associada	Referência
<i>α</i> Proteobacteria		
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Arroz	ENGELHARD et al. 2000
<i>Azospirillum brasilense</i>	Banana	WEBER et al. 1999
<i>Azospirillum amazonense</i>	Banana, abacaxi	WEBER et al. 1999
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Arroz	CHANTREUIL et al. 2000
<i>α</i> Proteobacteria		
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Cana-de-açúcar, café	CAVALCANTE and DÖBEREINER 1988; JIMÉNEZ-SALGADO et al. 1997
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Citrus	ARAUJO et al. 2002
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Pinheiro silvestre, citrus	ARAUJO et al. 2002; PIRTTILÄ et al. 2004
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Arroz	YANNI et al. 1997
<i>Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter</i>	Cenoura, arroz	SURETTE et al. 2003
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Batata doce	REITER et al. 2003
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Arroz	ENGELHARD et al. 2000
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Arroz	ENGELHARD et al. 2000
<i>β</i> Proteobacteria		

<i>Azoarcus</i> sp.	Gramíneas, arroz	ENGELHARD et al. 2000; REINHOLD-HUREK et al. 1993
<i>Burkholderia pickettii</i>	Milho	McINROY e KLOEPPER 1995
<i>Burkholderia cepacia</i>	Tremoço amarelo, citrus	ARAUJO et al. 2001; BARAC et al. 2004
<i>Burkholderia</i> sp.	Banana, abacaxi, arroz	WEBER et al. 1999; ENGELHARD et al. 2000
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Arroz	PHILLIPS et al. 2000
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo, banana	OLIVARES et al. 1996; WEBER et al. 1999
<i>Herbaspirillum rubrisulbalbicans</i>	Cana-de-açúcar	OLIVARES et al. 1996
γ Proteobacteria		
<i>Citrobacter</i> sp.	Banana	MARTÍNEZ et al. 2003
<i>Enterobacter</i> spp.	Milho	McINROY e KLOEPPER 1995
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Soja	KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004
<i>Enterobacter cloacae</i>	Citrus, milho	ARAUJO et al. 2002; HINTON et al. 1995
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Soja	KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004
<i>Enterobacter asburiae</i>	Batata doce	ASIS e ADACHI 2003
<i>Erwinia</i> sp.	Soja	KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004
<i>Escherichia coli</i>	Alface	INGHAM et al. 2005
<i>Klebsiella</i> sp.	Trigo, bata doce, arroz	ENGELHARD et al. 2000; INIGUEZ et al. 2004; REITER et al. 2003
γ Proteobacteria		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Soja	KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004
<i>Klebsiella variicola</i>	Banana, arroz, milho, cana-de- açúcar	ROSENBLUETH et al. 2004.
<i>Klebsiella terrigena</i>	Cenoura	Surette et al. 2003
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Soja	KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004
<i>Pantoea</i> sp.	Soja, arroz	KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004; VERMA et al. 2004
<i>Pantoea agglomerans</i>	Citrus, batata doce	ARAUJO et al. 2001, 2002; ASIS e ADACHI 2003
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Cenoura	STURZ e KIMPINSKI 2004; SURETTE et al. 2003
<i>Pseudomonas putida</i>	Cenoura	SURETTE et al. 2003
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cenoura	SURETTE et al. 2003
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Soja	KUKLINSKY-SOBRAL et al. 2004
<i>Pseudomonas synxantha</i>	Pinheiro Silvestre	PRITTILÄ et al. 2004
<i>Salmonella enterica</i>	Alfalfa, cenoura, tomate,	COOLEY et al. 2003; GUO et

	rabanete	al. 2002; ISLAM et al. 2004
<i>Serratia sp.</i>	Arroz	SANDHIYA et al. 2005
<i>Serratia marcescens</i>	Arroz	GYANESHWAR et al. 2001
<i>Stenotrophomonas</i>	Gramíneas de dunas (<i>Ammophila arenaria</i> and <i>Elymus mollis</i>)	DALTON et al. 2004
Firmicutes		
<i>Bacillus spp.</i>	Citrus	ARAUJO et al. 2001, 2002
<i>Bacillus megaterium</i>	Milho, cenoura, citrus	ARAUJO et al. 2001; McINROY e KLOEPPER 1995; SURETTE et al. 2003
<i>Clostridium</i>	Gramínea <i>Miscanthus sinensis</i>	MIYAMOTO et al. 2004
<i>Paenibacillus odorifer</i>	Batata doce	REITER et al. 2003
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cenoura	SURETTE et al. 2003
Bacteroidetes		
<i>Sphingobacterium sp.</i>	Arroz	PHILLIPS et al. 2000
Actinobacteria		
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Milho	CHELIUS e TRIPLETT 2000a
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Citrus	ARAUJO et al. 2002
<i>Kocuria varians</i>	Margarida	STURZ e KIMPINSKI 2004
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	Margarida	STURZ e KIMPINSKI 2004
<i>Microbacterium testaceum</i>	Milho	ZINNIEL et al. 2002
<i>Mycobacterium sp.</i>	Trigo, pinheiro silvestre	CONN e FRANCO 2004; PRITILÄ et al. 2005
<i>Nocardia sp.</i>	Citrus	ARAUJO et al. 2002
<i>Streptomyces</i>	Trigo	COOMBS e FRANCO 2003a

Fonte: ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO (2006).

Vivendo em associação com a planta, as bactérias endofíticas podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de influenciarem as populações de outros micro-organismos presentes no interior da planta e na região de influência do vegetal, como a rizosfera (ANDREOTE et al., 2006). O fato de serem capazes de colonizar os tecidos internos das plantas confere vantagem ecológica sobre outras bactérias capazes de colonizar apenas epifiticamente seus hospedeiros. Nos tecidos internos, o micro-organismo encontra condições ambientais mais uniformes, onde as variações de determinados fatores limitantes do crescimento, como temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta, são menos estressantes (HALLMANN et al., 1997; LODEWYCKX et al., 2002). Ainda assim, as populações endofíticas, bem como as populações rizosféricas ou epifíticas, são condicionadas por fatores bióticos (outros micro-organismos, parasitas e planta hospedeira) e abióticos (nutrientes e outros fatores físicos e químicos do ambiente), tanto em termos quantitativos

quanto qualitativos (FUENTES RAMÍREZ et al., 1999; HALLMANN et al., 1997; SICILIANO et al., 2001; REITER et al., 2002; SEGHERS et al., 2004).

Há vários efeitos positivos atribuídos às bactérias endofíticas aplicadas na agricultura. Entretanto, os principais e mais estudados benefícios para a planta hospedeira são: o controle biológico de pragas e doenças e a promoção do crescimento vegetal, ambos realizados por vários mecanismos, direto e/ou indiretos (AZEVEDO et al., 2002; BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001; DOBBELAERE et al., 2003; GLICK, 1995; HALLMANN et al., 1997; LODEWYCKX et al., 2002; STURZ et al., 2000).

Os mecanismos envolvidos no controle de pragas e doenças são os mais diversos. Competição por sítios de colonização e por nutrientes exsudados das raízes são mecanismos pelos quais as bactérias protegem as plantas contra fitopatógenos (DUFFY, 2001). As bactérias também podem atuar como agentes de biocontrole, produzindo os mais diversos compostos químicos, como os sideróforos, antibióticos, biocidas voláteis, enzimas líticas como quitinases e glicanases, além de enzimas de detoxificação que evitam a ocorrência de sintomas de toxicidade/toxidez na planta em resposta a presença de fitopatógenos (AIT BARKA et al., 2002; GLICK, 1995; STURZ e CHRISTIE, 2003). Algumas bactérias endofíticas podem ainda estimular mecanismos de resistência induzida nas plantas hospedeiras, sendo já verificada a redução de doenças fúngicas, bacterianas e até virais, e, em alguns casos, diminuição de injúrias causadas por nematóides e insetos (KERRY, 2000; PING e BOLAND, 2004; RAMAMOORTHY et al., 2001; STURZ et al., 2002). As linhagens endofíticas de *Pseudomonas fluorescens* Endo2 e Endo35 induziram proteção sistêmica contra *Macrophomina phaseolina*, agente causal de podridão seca da raiz em *Vigna mungo* (KARTHIKEYAN et al., 2005). Uma linhagem de *Burkholderia cepacia*, isolada de aspargo, colonizou espaços intercelulares de raízes de banana e controlou o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Foi observado *in vitro* que esta bactéria colonizou a superfície da hifa do patógeno, resultando na deformação do micélio e redução da patogenicidade do fungo (PAN et al., 1997). Um estudo da comunidade bacteriana endofítica de batata revelou a alta incidência de isolados que apresentam antibiose ao fungo patogênico *Rhizoctonia solani* (STURZ et al., 1998). A capacidade de uma bactéria endofítica ativar o sistema de resistência do hospedeiro foi demonstrada em tomate, no qual a aplicação da linhagem *Pseudomonas* sp. PsJN induziu resistência sistêmica e controlou o patógeno *Verticillium dahliae* (SHARMA e NOWAK, 1998; KAVINO et al., 2007). ASSUMPCÃO et al. (2009) relatam que há uma comunidade bacteriana endofítica cultivável bastante diversificada em sementes de soja, sendo que muitos desses isolados são capazes de sintetizar

ácido indolacético, solubilizar fosfato e inibir o crescimento e esporulação de fungos fitopatogênicos.

Além do controle de pragas e doenças, bactérias endofíticas têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitormônios) e por mecanismos indiretos (antagonismo contra patógenos ou resistência a estresse) (PEIXOTO NETO et al., 2002). O trabalho de BARRETI et al. (2008) verificou que endofíticos isolados de folhas e caule do tomateiro foram introduzidos em plantas que tiveram o crescimento aumentado em altura, área foliar, número de folhas e massa da matéria fresca e seca. A produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas tem sido observada também em bactérias como as dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (WEBER et al., 2000), em que foi demonstrada pela primeira vez a contribuição de bactérias diazotróficas no crescimento de bananeira. A introdução do isolado BH72 da bactéria endofítica diazotrófica *Azoarcus* sp. em plantas de arroz também resultou em crescimento significativo das plantas (HUREK et al., 1994).

Apesar da existência dos vários mecanismos de promoção de crescimento já expostos, o mecanismo mais estudado de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas compreende a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a transferência e/ou a disponibilização deste nitrogênio assimilado para o metabolismo vegetal (OLIVEIRA et al., 2003).

O N_2 é pouco reativo e somente algumas espécies de micro-organismos procarióticos possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformá-lo em amônia que é subsequentemente assimilado em aminoácidos e proteínas (NEVES e RUMJANEK, 1998; ZEHR et al., 2003). Este é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados *nif* (“nitrogen fixation”), os quais codificam proteínas envolvidas neste processo (CERIGIOLI, 2005).

A fixação biológica de nitrogênio foi inicialmente descrita em bactérias diazotróficas da rizosfera e do rizoplano de uma grande variedade de plantas não leguminosas (DÖBEREINER, 1992). Porém, evidências recentes mostram que algumas bactérias diazotróficas colonizam o interior da planta e são conhecidas como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (OLIVARES et al., 1996; URETA et al., 1995). Estudos sobre o balanço de nitrogênio fornecem evidências da ocorrência de fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas, especialmente em gramíneas, tanto sob condições controladas como em condições de campo (OLIVEIRA et al., 2003).

A possibilidade da ocorrência de aumentos significativos na disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN para gramíneas, tais como arroz (BODDEY et al., 1995), cana-de-açúcar (JAMES, 2000), milho, sorgo e trigo (RONCATO-MACCARI et al., 2003) foi demonstrada há alguns anos. Entre as várias bactérias encontradas associadas a essas plantas, destacam-se espécies de *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiela*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Acetobacter* e a família *Rhizobiaceae* (IKEDA, 2010).

A produção de soja no Brasil é um exemplo da eficiência da FBN, pois desde que foram realizados programas de melhoramento para fixação de N₂, tendo resultado no desenvolvimento de inoculantes com linhagens selecionadas de *Bradyrhizobium*, a cultura tornou-se independente de fertilizantes químicos nitrogenados (DOBEREINER, 1992; DOBEREINER et al., 1995; ALVES et al., 2003). UEDA et al. (1995) realizaram um trabalho com genótipos de arroz, cultivados em condições inundadas e mostraram que a FBN contribui para obtenção do nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento. Várias bactérias diazotróficas endofíticas, representantes dos gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum* foram identificadas em associação com variedades de arroz.

Entre os micro-organismos diazotróficos endofíticos citados, o gênero *Azospirillum* é o mais estudado e tem sido usado como modelo para investigações da associação entre bactérias diazotróficas e cereais (ZAKHAROVA et al., 1999). Organismos do gênero *Azospirillum* são bactérias Gram negativas fixadoras de nitrogênio classificadas inicialmente como bactérias de vida livre. Entretanto, existem relatos da associação destes micro-organismos com as raízes das plantas e da presença destes no interior dos tecidos, vivendo endofiticamente nos espaços intercelulares (SUMNER, 1990). Sendo assim, *Azospirillum* spp. é classificado como endofítico facultativo. O gênero apresenta um metabolismo bastante versátil o que confere características adaptativas, permitindo o estabelecimento competitivo na rizosfera (STEENHOUDT e VENDERLEYDEN, 2000). Essas características conferem ao gênero a habilidade de promover o crescimento de mais de 100 espécies de cereais e leguminosas (BASHAN et al., 2004). Aparentemente, a inoculação de *Azospirillum* spp. pode reduzir o uso de fertilizantes químicos, especialmente nitrogênio, na ordem de 20 a 50% sendo que resultados superiores já foram obtidos quando a inoculação foi utilizada juntamente com a incorporação de fertilizantes orgânicos (BASHAN et al., 2004).

A exploração agrícola da FBN tem sido motivada pela conscientização ecológica sobre o uso intensivo de agroquímicos e pela diminuição dos custos de produção.

Com isso, a exploração e o entendimento da interação entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio se fazem cada vez mais necessários.

A utilização de bactérias endofíticas na produção agrícola irá depender do conhecimento sobre os mecanismos de interação bactéria-planta e da habilidade de manter, manipular e modificar populações benéficas sob condições de campo. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de um melhor conhecimento sobre estes mecanismos, a fim de se conseguir com sucesso a utilização prática destes micro-organismos na agricultura, na indústria e em processos biotecnológicos (SOBRAL, 2003).

2.3 A IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie pertencente à família Poaceae (Gramineae), considerada a mais importante planta comercial com origem nas Américas, possivelmente no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Logo depois do descobrimento da América, o milho foi levado para a Europa, aonde foi cultivado em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Desde então, o milho passou a ser cultivado em todo o mundo em escala comercial (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000).

Assim sendo, o milho, ao lado do trigo, passou a ser o cereal mais produzido no mundo. No entanto, enquanto o trigo é praticamente todo consumido na alimentação humana, o milho, em razão de sua versatilidade, é utilizado tanto para o consumo humano, quanto animal e também em várias aplicações industriais (BOBATO, 2006). A Tabela 2 mostra a evolução da produção mundial e brasileira do milho entre 2002 a 2012.

Tabela 2 - Evolução da produção mundial e brasileira do milho de 2002 a 2012 em milhões de toneladas.

Ano	Mundo (A)	Brasil (B)
	Produção (t x 10 ⁶)	Produção (t x 10 ⁶)
2002	601,0	35,3
2003	603,2	47,4
2004	627,5	42,9
2005	715,8	35,0
2006	699,7	42,5
2007	714,0	51,4
2008	794,7	58,7
2009	799,2	51,0
2010	819,2	56,0
2011	827,6	57,5
2012	860,0	61,0

Fonte: USDA (2011).

Atualmente, a cultura do milho apresenta grande importância econômica. A demanda mundial vem aumentando nos últimos anos, impulsionada pelo crescimento econômico dos países asiáticos, que são os maiores importadores do grão, e pela utilização do cereal nos Estados Unidos para a produção de etanol. O consumo interno também tem aumentado de forma considerável, em decorrência de sua utilização na alimentação humana e do crescimento do setor de carnes, principalmente de aves e suínos, já que o milho é muito utilizado como ração animal (PAVÃO, 2011). Na cadeia produtiva de suínos e aves são consumidos aproximadamente 70% da produção mundial e entre 70 e 80% da brasileira (DUARTE, 2007).

A produção mundial de milho no ano agrícola de 2011/2012 foi de, aproximadamente, 860 milhões de toneladas, da qual os Estados Unidos foram responsáveis por 315,8 milhões de toneladas, a China por 182 milhões de toneladas e o Brasil por 61 milhões de toneladas (USDA, 2011). No entanto, o mercado mundial de milho é abastecido basicamente por três países: os Estados Unidos, a Argentina e a África do Sul. A principal vantagem destes países é uma logística favorável, que pode ser decorrente da excelente estrutura de transporte (caso dos EUA), proximidade dos portos (caso da Argentina) ou dos compradores (caso da África do Sul). O Brasil eventualmente participa deste mercado, porém,

a instabilidade cambial e a deficiência da estrutura de transporte até os portos têm prejudicado o país na busca de uma presença mais constante no comércio internacional de milho (DUARTE, 2007).

Alguns fatores têm contribuído para melhorar a produtividade de milho no Brasil, tais como a adaptação de genótipos às mais variadas situações de clima e solo, o melhoramento genético, a melhoria de propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos cultivados e a adoção de práticas culturais. Assim sendo, apesar de a produtividade ainda ser considerada baixa quando comparada com a dos principais países produtores, pode-se afirmar que o Brasil tem obtido grandes avanços neste índice, o qual pode e deve ser melhorado (BOBATO, 2006).

A produção de milho no Brasil tem se caracterizado pela divisão da produção em duas épocas de plantio. Os plantios de verão, ou primeira safra, são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto na região Sul até os meses de outubro/novembro no Sudeste e Centro Oeste (no Nordeste este período ocorre no início do ano). Mais recentemente tem aumentado a produção obtida na chamada "safrinha", ou segunda safra. A segunda safra se refere ao milho plantado em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos Estados do Paraná e São Paulo (DUARTE, 2007).

Segundo dados do IBGE (2011), a produção nacional do milho em grão em 2011, para ambas as safras, totalizou 57,5 milhões de toneladas, sendo 34,1 milhões de toneladas na primeira safra. A participação na produção nacional, segundo as três maiores regiões produtoras, encontra-se assim distribuída: Sul (45,4%), Sudeste (27,9%) e Nordeste (12,4%). Para o milho 2ª safra, estima-se uma produção de 23,4 milhões de toneladas, as regiões Centro-Oeste e Sul concentram 90,5% da produção nacional com participações individuais de 62,5% e 28,0%, respectivamente.

2.3.1 Importância do Nitrogênio para a Cultura de Milho

A cultura de milho apresenta alto potencial de produtividade, porém, a média brasileira ainda é considerada baixa, quando comparada à da China e dos Estados Unidos. Dentre os principais fatores que contribuem para essa baixa produtividade de áreas destinadas tanto à produção de grãos como de forragem de milho, destaca-se a fertilidade do solo e o uso inadequado de adubações, principalmente com nitrogênio (N) (HOEFT, 2003; VALDERRAMA et al., 2011).

Depois da deficiência hídrica, a de N pode ser considerada o fator que mais limita a produtividade de biomassa em ecossistemas naturais e agrícolas, já que, para se obter alta produtividade, a quantidade de N disponível no solo não é suficiente para suprir a demanda de plantas como o milho (BOBATO, 2006). Além disso, o N é o nutriente que mais onera o custo de produção da cultura (SILVA et al., 2005). De acordo com FANCELLI e DOURADO NETO (2000), a deficiência de N pode reduzir o rendimento de grãos entre 14 e 80%, e o custo com adubação nitrogenada chega a representar cerca de 40% do custo total de produção da cultura.

Nas últimas décadas, grande parte do N fornecido à cultura de milho tem sido proveniente de adubos sintéticos, o que gera preocupação com relação à poluição de águas e solo. A quantidade de N aplicado tem apresentado um aumento significativo, devido principalmente, ao melhoramento de genótipos de milho que se tornaram mais exigentes, requerendo maiores quantidades de N para alta produtividade (MATSON et al., 1998).

Do ponto de vista econômico e ambiental, a decisão sobre a necessidade de adubação nitrogenada deve levar em consideração alguns fatores, tais como: condições edafoclimáticas, sistema de cultivo, época de semeadura, responsividade do material genético, rotação de culturas, época e modo de aplicação, fontes de N e aspectos econômicos (BOBATO, 2006). A recomendação da adubação nitrogenada em cobertura para a cultura do milho varia de 40 a 80 kg de N/ha. Com o uso de alta tecnologia, doses de nitrogênio variando de 100 a 150 kg/ha podem ser necessárias para a obtenção de elevada produtividade (EMBRAPA, 2008). A média da região sul de custo com adubação nitrogenada para o cultivo de milho chega a R\$ 700,00 por hectare (PORTAL DO AGRONEGOCIO, 2008). Um agravante na utilização de fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, raramente ultrapassando 50 %. Metade do fertilizante nitrogenado aplicado é perdida por processos de lixiviação (lavagem no perfil do solo por percolação ou escoamento superficial), resultando no acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis subterrâneos; e transformação em formas gasosas, tanto pela desnitrificação como pela volatilização (HUNGRIA, 2001).

Nesse contexto, a busca de alternativas para diminuir o consumo de fertilizantes nitrogenados fez ampliar, na década de 70, pesquisas para a busca de novas fontes de N (REIS, 2009). Estudos demonstraram que a viabilidade do uso de micro-organismos promotores de crescimento vegetal, a partir da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, juntamente com a seleção de linhagens mais eficientes, são de grande

importância para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados na cultura (TEIXEIRA, 1997).

2.3.2 O Uso de Inoculantes na Cultura de Milho

A técnica de inoculação com micro-organismos promotores de crescimento vegetal tem contribuído com a redução do uso de fertilizantes nitrogenados em algumas culturas como o milho (DAMASCENO, 2011). O inoculante é caracterizado como o material que contém micro-organismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas, composto por bactérias específicas para cada espécie vegetal. Sendo assim, a utilização destes produtos pode aumentar a produtividade de determinada cultura, melhorar a qualidade dos solos e reduzir o impacto ambiental e os custos de produção que a adubação nitrogenada acarreta (EMBRAPA, 2008). Para muitos cultivos importantes no Brasil, faz-se necessária a produção de formulações eficientes de inoculantes, a otimização de tecnologias de inoculação e de metodologias para avaliação da qualidade destes inoculantes (DAMASCENO, 2011). Estudos realizados por KEYSER (1992) demonstraram que outros fatores que caracterizam um veículo de inoculação adequado referem-se à facilidade de obtenção e esterilização (por autoclave ou radiação), manutenção da infectividade e efetividade das estirpes inoculadas durante o período de estocagem, e ausência de toxicidade aos seres humanos, animais e plantas.

As principais formulações de inoculantes utilizadas são as turfosas e as líquidas. A formulação turfosa, para que seja utilizada como veículo para inoculantes, deve possuir acima de 80% de matéria orgânica, baixo teor de cloretos e ausência de areia, para não causar danos às máquinas semeadoras (CÂMARA, 1998). O inoculante líquido é composto por um substrato estéril que simplifica o processo de produção, uma vez que pode ser produzido e esterilizado na própria indústria e, por sua natureza fluída, a adesão dos micro-organismos e a aplicação em sementes ou no campo, torna-se facilitada. No entanto, a sobrevivência de bactérias nesse tipo de inoculante e nas sementes inoculadas é dificultada, já que as bactérias não ficam tão protegidas do estresse ambiental quanto os micro-organismos presentes no inoculante em turfa (SINGLETON et al., 2002; TITTABUTR et al., 2007). Outros substratos e aditivos vêm sendo testados, como argila, carvão, fosfato de rocha, alginato, CMC (carboximetilcelulose), goma xantana, goma arábica, glicerol e PVP (polivinilpirrolidona), e alguns já se mostraram promissores em ampliar a sobrevivência dessas bactérias (STEPHENS e RASK, 2000).

De acordo com HUNGRIA (2011), o primeiro inoculante comercial brasileiro para milho foi desenvolvido em 1996 pela Embrapa Soja e pela Universidade Federal do Paraná em parceria com a iniciativa privada. O produto é comercializado a R\$10,00 a dose/hectare e a inoculação é feita pela aplicação do produto sólido ou líquido nas sementes. Como o inoculante carrega micro-organismos vivos, faz-se necessário monitorar aspectos para sua manutenção, tais como: temperatura, não exposição direta ao sol e não aplicação conjunta com agrotóxicos. Os trabalhos que levaram ao desenvolvimento do inoculante foram realizados com seis estirpes de *Azospirillum brasilense* e mostraram incremento de 24 a 30% no rendimento do milho, em relação ao controle não inoculado. Isso resultou na autorização pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento) das estirpes de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para a produção de inoculantes para a cultura do milho. No Brasil, considerando somente a reposição parcial do fertilizante nitrogenado (50%) requerido por culturas como o milho, a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas e o preço médio tradicional dos fertilizantes no mercado nacional a US\$ 1 por kg de N, estima-se que o uso dos inoculantes contendo as estirpes selecionadas de *Azospirillum brasilense* pode resultar em uma economia estimada de US\$ 2 bilhões por ano. Além da redução dos custos que estariam relacionados ao transporte do fertilizante nitrogenado. Desse modo, o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal, que apótem nitrogênio via fixação biológica, representa uma estratégia viável economicamente, além dos benefícios ambientais associados à redução no uso de fertilizantes (HUNGRIA, 2011).

2.3.3 Bactérias Endofíticas Associadas ao Milho

As plantas de milho podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias endofíticas (CHELIUS e TRIPLETT, 2001; LODWYCKX et al., 2002). Recentemente, muitos micro-organismos diazotróficos têm sido encontrados colonizando plantas de milho (OLIVARES et al., 1996; STEENHOUDT e VANDELEYDEN, 2000; CHELIUS e TRIPLETT, 2001). Contudo, a maioria dos estudos de diversidade realizados até o presente foram baseados em técnicas de cultivo e subsequente caracterização dos isolados, o que fornece informações limitadas, já que a maioria dos micro-organismos existentes não é facilmente isolada por meio de técnicas de cultivo convencionais (ROESCH, 2007).

Relatos da associação de bactérias do gênero *Azospirillum* e *Klebsiella* são os mais frequentes em estudos da interação de diazotróficos com o milho. Ambos gêneros já foram detectados por estudos baseados em cultivo e isolamento (BALDANI e DOBEREINER, 1980; BALDANI et al., 1986; PALUS et al., 1996) bem como estudos baseados em técnicas independentes de cultivo (CHELIUS e TRIPLETT, 2001).

As bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, quando associadas à rizosfera das plantas, podem, possivelmente, contribuir com a sua nutrição nitrogenada (BODDEY, 1995). Conforme CAVALETT et al. (2000), o efeito da bactéria *Azospirillum* spp. no desenvolvimento do milho e em outras gramíneas, tem sido pesquisado nos últimos anos, não somente quanto ao rendimento das culturas, mas também, com relação às causas fisiológicas que, possivelmente, aumentam esse rendimento. Além disso, a bactéria possui ainda os seguintes benefícios como inoculante: é uma bactéria endofítica, ou seja, penetra na raiz das plantas; apresenta antagonismo a agentes patogênicos; produz fitormônios; não é muito sensível às variações de temperatura e ocorre em todos os tipos de solo e clima (ARAÚJO, 2008).

O gênero *Burkholderia* também tem sido apontado como de ampla ocorrência em associação com o milho cultivado no Brasil e no México (PERIN et al., 2006) sendo que a espécie *B. tropica* tem sido detectada com mais frequência. A ocorrência destes organismos em associação com o milho em diferentes regiões geográficas pode indicar que certos gêneros de bactérias diazotróficas estão associados preferencialmente ao milho, independente do tipo de solo e do clima da região do cultivo (ROESCH, 2007).

Além dos organismos diazotróficos citados anteriormente, o gênero *Rhizobium* também já foi detectado infectando o interior dos tecidos de plantas de milho, principalmente em plantas coletadas em lavouras cultivadas no sistema de rotação de culturas com leguminosas. Embora este gênero seja bem estudado na associação com plantas leguminosas, pouco se sabe sobre os efeitos quando associadas a gramíneas. Entretanto, o aumento no crescimento do milho devido a produção de fitormônios excretados por bactérias do gênero *Rhizobium* já foi constatado (CHABOT et al., 1996; SCHLOTTER et al., 1997). GUTIÉRREZ-ZAMORA e MARTÍNEZ-ROMERO (2001) detectaram a presença de isolados de *R. etli* colonizando o interior de plantas de milho cultivadas em associação com feijão em solo de baixa fertilidade no México. A espécie diazotrófica *Rhizobium tropici* isolado CIAT899, utilizada com sucesso na inoculação de *Phaseolus vulgaris*, também foi reconhecida por ROSENBLUETH e MARTINEZ-ROMERO (2006) como uma espécie

endofítica competitiva capaz de se associar a plantas de milho em experimentos de inoculação, o que demonstra que estes organismos estão naturalmente associados ao milho.

Tem-se verificado também o predomínio de bactérias do gênero *Sphingomonas* sp. colonizando endofiticamente o milho. Tais bactérias não são descritas como fixadoras de nitrogênio, porém, PEDRINHO et al. (2010) verificaram que a inoculação de bactérias do gênero *Sphingomonas* sp. no milho foi estatisticamente semelhante aos resultados obtidos pela inoculação com *Azospirillum* sp. no que se refere à massa seca e a altura da planta, indicando que este micro-organismo possui potencial para ser utilizado como promotor de crescimento vegetal.

2.4 A DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Os procariotos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade dos ecossistemas, sendo responsáveis por conduzirem transformações indispensáveis para a continuidade dos ciclos biogeoquímicos da biosfera (WHITMAN, 1998). A extraordinária atividade desses micro-organismos está baseada em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética, o que os permite ocupar e colonizar todos os nichos possíveis; e os tRNA uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável (SANTOS, 2008).

As plantas constituem um verdadeiro sistema ecológico com grande diversidade de bactérias associadas (SANTOS, 2008). Conhecer essas bactérias associadas às plantas de milho é de fundamental importância, pois aliado ao programa de melhoramento genético do milho, podem auxiliar no desenvolvimento de cultivares com características vegetativas associadas a um elevado potencial produtivo, possibilitando ainda a produção com menor custo e reduzida aplicação de agrotóxicos no controle de pragas e doenças (SANTOS, 2008).

Diante disso, os benefícios científicos, econômicos e estratégicos esperados de um melhor conhecimento da diversidade microbiana são extensos (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998) e envolvem, entre outros, o melhor entendimento das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade (TYSON et al., 2004; VENTER et al., 2004; DANIEL, 2005; WOYKE et al., 2006; DINSDALE et al., 2008), a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos e otimização das capacidades microbianas conhecidas (HENNE et al., 2000; GILLESPIE et al., 2002;

COURTOIS et al., 2003; LORENZ e ECK, 2005; SUENAGA et al., 2007), além do prognóstico e da prevenção de doenças emergentes (MANICHANH et al., 2006).

Várias metodologias são propostas para estudos que envolvem a ecologia microbiana endofítica de culturas como o milho. A diversidade biológica é geralmente utilizada como índice que reflete a qualidade do ecossistema, de modo que as metodologias que possibilitam o estudo da biodiversidade também possam indicar diferenças entre os ambientes, tanto com respeito a suas populações quanto a suas funções (TURCO et al., 1994).

2.4.1 Técnicas Moleculares na Análise de Bactérias Endofíticas

Classicamente, a investigação da diversidade microbiana e dos diversos processos biológicos conduzidos por micro-organismos nos diferentes ambientes requer como passo primordial, a obtenção de culturas puras. Essa abordagem tradicional, que emprega técnica dependente de cultivo, entretanto, permite que apenas uma pequena fração, 1% ou menos, da diversidade microbiana seja acessível (TORSVIK et al., 1990; AMANN et al., 1995; PACE, 1997; HUGENHOLTZ, 1998; TORSVIK et al., 2002).

A utilização de técnicas moleculares para os estudos de comunidades microbianas que não são cultiváveis e que apresentam as mais variadas exigências em relação aos fatores nutricionais, químicos e físicos, se constituem em alternativa para o estudo da diversidade genética de espécies microbianas na natureza (MUYZER e SMALLA, 1998; DeLONG, 2004). O desenvolvimento e o aprimoramento dessas metodologias independentes de cultivo oferecem oportunidade para estimar, de forma mais real, a diversidade microbiana existente (MUYZER e SMALLA, 1998; RAPPE e GIOVANNONI, 2003). TORSVIK et al. (1990), utilizaram técnicas moleculares para estudar comunidades bacterianas de solo sob uma floresta decídua. No estudo, os autores encontraram 4.000 diferentes genomas, sendo uma estimativa 200 vezes maior do que a obtida por análises convencionais.

A partir da década de 80, e com o advento das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (SAIKI et al., 1988) e sequenciamento de DNA (SANGER et al., 1977), um grande número de metodologias moleculares vem sendo desenvolvidas para análise da diversidade microbiana em diferentes ambientes (AMANN et al., 1995; ZHOU et al., 1996; BORNEMAN et al., 1997; CULLEN et al., 1998; DUARTE et al., 1998; SANDAA et al., 1998; TORSVIK et al., 1998), tais como: análise de restrição do DNAr amplificado (ARDRA), polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (TRFLP), amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), análise do espaço ribossomal

intergênico (RISA), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) e polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) (TORSVIK, 2002). No entanto, em procariotos, a técnica mais utilizada é a análise do gene 16S do RNA ribossomal (AMANN et al., 1995).

WOESE (1987) foi quem iniciou os estudos com o gene 16S RNAr. Ele descreveu que esta molécula era um excelente marcador molecular pelos seguintes motivos: está presente e tem a mesma função em todos os micro-organismos; se originou de um ancestral comum, portanto é uma molécula homóloga; é considerada uma molécula de longa (~1500 bp) e contém sequências informativas suficientes para permitir comparações estatisticamente significativas; a estrutura primária dessa molécula possui sítios de evolução independente, conseqüentemente contém suficiente regiões variáveis para permitir a discriminação entre diferentes moléculas.

O fato de essas moléculas possuírem sítios de rápida e outros de lenta evolução permite que se avalie as relações filogenéticas tanto entre organismos muito proximamente relacionados quanto entre os filogeneticamente muito distantes. Com isso, o gene 16S RNAr gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (REIS JUNIOR, 2002).

A partir disso, uma estratégia amplamente utilizada na atualidade para acessar a diversidade genética e fisiológica de micro-organismos não cultiváveis é baseada na extração de DNA total, diretamente das amostras ambientais, seguidas da amplificação do gene 16S RNAr por PCR para a construção de bibliotecas genômicas, onde é realizada a caracterização por clonagem e sequenciamento dos fragmentos amplificados. Essa abordagem baseada na análise, em larga escala, de genomas de micro-organismos no seu habitat natural é denominada de metagenômica (HANDELSMAN et al., 1998; HANDELSMAN, 2004; RIESENFELD et al., 2004). Além disso, outra estratégia pode ser a construção de bibliotecas de DNAc (DNA complementar a um RNA mensageiro), a partir da extração total de RNA das amostras ambientais, transcrição do RNA a DNAc pela enzima transcriptase reversa, amplificação com iniciadores específicos, clonagem e sequenciamento dos fragmentos. Tal estratégia é importante, pois os fragmentos clonados representam sequências de genes expressos, sob influência de uma determinada condição do ambiente, num determinado momento e desta forma, reflete predominantemente a diversidade de micro-organismos metabolicamente ativos na comunidade (MALONE et al., 2006; NOGALES et al., 2001).

A análise do DNA total de uma amostra constitui uma medida de sua heterogeneidade, inferindo-se a diversidade microbiana presente na mesma. Tal estratégia

acessa muito mais informação genética que os procedimentos baseados em cultivo. Bibliotecas do gene 16S RNAr constituem, portanto, uma ferramenta útil para o estudo do conteúdo genômico total da microbiota endofítica associada às plantas. Através de clonagem e análise de segmentos de DNA microbiano, pode-se avaliar com mais detalhes a fisiologia e a função dos micro-organismos na natureza (RONDON et al., 1999).

3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo identificar e analisar filogeneticamente a diversidade da comunidade bacteriana endofítica associada a plantas de milho, cultivadas sob diferentes tratamentos e avaliar o impacto da utilização de fertilizante nitrogenado e da inoculação do *Azospirillum brasilense* sobre a diversidade da comunidade bacteriana em associação com o milho.

4 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Molecular e nos Laboratórios de Bioquímica e Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina-PR); no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba-PR) e no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa-Soja (Londrina-PR).

4.1 EXPERIMENTO DE CAMPO

O experimento de campo foi realizado em área da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (23°20'23.45"S; 51°12'32.28"O) (Figura 1), com altitude média de 580 metros, no município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. O clima da região é do tipo Cfa (Köppen), clima subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência de concentração de chuvas no verão e sem estação seca definida. O solo é classificado como Latossolo Vermelho eutrófico, argiloso, com declividade de 9%. A temperatura média anual é de 20,2 °C, a média da temperatura máxima é de 27,0 °C e a média da temperatura mínima é de 14,8 °C. A umidade relativa do ar média é de 75% (IAPAR, 2007).

Figura 1 - Imagem referente à área da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, no município de Londrina, PR. A seta indica o local onde foi instalado o experimento de campo do presente trabalho.



Fonte: < <http://www.uel.br/fazendaescola/mapa/mapa.jpg> >
Acesso em: 14/12/2011

A análise química do solo foi realizada antes da semeadura na profundidade de 0 a 20 cm por SANTOS (2011), e está apresentada na Tabela 3. As características de fertilidade do solo na área experimental apresentaram-se adequadas para a cultura do milho, com valores de fertilidade entre médio e alto para os parâmetros avaliados, dispensando a correção do pH (EMBRAPA-MS, 2010).

Tabela 3 - Análise química do solo da área experimental.

Variável	Valor
pH	5,40
(Hidrogênio + Alumínio)	3,97 cmolc dm ³ ⁻¹
Potássio	0,46 cmolc dm ³ ⁻¹
Cálcio	6,60 cmolc dm ³ ⁻¹
Magnésio	1,30 cmolc dm ³ ⁻¹
Alumínio	0,01 cmolc dm ³ ⁻¹
Saturação de bases	67,75 %
Fósforo	10,70 mg Kg ⁻¹
Matéria orgânica	2,06 %

Fonte: SANTOS (2011).

Com o objetivo de comparar os efeitos da adubação nitrogenada e da inoculação do *Azospirillum brasilense* sobre a composição qualitativa da comunidade de micro-organismos endofíticos na cultura, o milho híbrido AG 2040 (Monsanto) foi cultivado sob diferentes tratamentos. Todas as parcelas receberam doses de 136 kg ha⁻¹ de K₂O e 77 kg ha⁻¹ de P₂O₅, variando somente quanto a aplicação de nitrogênio (N), e quanto ao veículo e a forma de inoculação com *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5. Desta forma os tratamentos foram instalados combinando-se as doses de N: A0: Sem aplicação de N e A2: 160 Kg ha⁻¹ de N; com os diferentes tipos de inoculação: I0: Sem inoculante; I1: Inoculante em turfa aplicado na semente; I3: Inoculante líquido aplicado em pós emergência (Tabela 4). Todos os fertilizantes foram aplicados manualmente à lança no sulco de semeadura.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 3, com 4 repetições. As parcelas foram contruídas com dimensões de 6 m de comprimento e 5,4 m de largura. Entre as parcelas foram inseridos corredores de 1,2 m e entre os blocos foram inseridos corredores de 1,5 m. Nas laterais da área foram implantados como bordadura 1,8 m e no sentido longitudinal foram deixados 7 m de bordadura. A área total do experimento foi de 2700 m².

Tabela 4 - Combinação dos tratamentos utilizados para o cultivo do milho.

Tratamentos	Adubação nitrogenada	Metodologia de inoculação
A0I0	Sem aplicação	Sem inoculante
A0I1	Sem aplicação	Inoculante em turfa
A0I3	Sem aplicação	Inoculante líquido pós emergente
A2I0	160 Kg ha ⁻¹ de N	Sem inoculante
A2I1	160 Kg ha ⁻¹ de N	Inoculante em turfa
A2I3	160 Kg ha ⁻¹ de N	Inoculante líquido pós emergente

Fonte: A autora (2012).

A semeadura foi efetuada manualmente em novembro de 2010 por meio de matraca, em linhas espaçadas 0,9 m entre si, com a densidade de sete sementes por metro linear de plantio, o que corresponde a uma população de 65.000 plantas por hectare. O inoculante líquido foi preparado conforme MARCELINO (2012) e a turfa utilizada para o preparo do inoculante foi cedida pela Embrapa Agrobiologia, previamente neutralizada e esterilizada. A concentração de células de *A. brasilense* nos inoculantes foi de 10⁹ células por mL ou g, para ambos inoculantes.

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A coleta das amostras para análise molecular foi realizada 30 dias após a semeadura. Foram coletadas aleatoriamente três plantas de cada tratamento, obtendo 18 amostras, as quais tiveram frações de aproximadamente 5 cm da base do colmo (região intermediária entre a raiz e a parte aérea da planta) retiradas, acondicionadas em tubos Falcon e armazenadas em freezer a -20 °C até o seu processamento. A fim de se obter somente representantes bacterianos endofíticos, foi utilizada para a extração de DNA e RNA total, somente a região central das amostras de colmo.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

4.3.1 Extração de DNA total.

A fim de se obter ácidos nucleicos representativos quanto das espécies de micro-organismos componentes da comunidade microbiana associada a cada tratamento, foram feitas extrações de DNA total, diretamente do colmo do milho, de todas as amostras coletadas, utilizando-se o protocolo proposto por DOYLE e DOYLE (1991).

Aproximadamente 1 g das amostras de colmo de milho foi macerado em nitrogênio líquido até sua granulação adequada (aspecto de talco). Cada uma das amostras maceradas foi transferida para tubo estéril de microcentrífuga de 2 mL, devidamente identificado. A amostra foi homogeneizada pela adição de 300 µL de tampão de extração [CTAB 2%; PVP 2%; Tris-HCl 100 mM (pH 8,0); EDTA 25 mM (pH 8,0) e NaCl 2 M], agitação em vórtex por 5 minutos e 30 minutos de incubação em banho-maria a 65 °C. Após a incubação, esperou-se as amostras atingirem temperatura ambiente, adicionaram-se 300 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v) e agitaram-se os tubos por suaves inversões durante 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos novos e estéreis. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de isopropanol gelado, seguido de homogeneização por suaves inversões por 1 minuto. Incubaram-se as amostras a -20 °C por 30 minutos, centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Os péletes formados foram lavados com 200 µL de etanol 70% gelado, centrifugando-se nas mesmas condições anteriores. Secaram-se as amostras sobre papel absorvente por 20 minutos e ressuspenderam-se os péletes formados com 50 µL de água miliQ estéril, adicionada de RNase 40 µg mL⁻¹ (Invitrogen). A suspensão foi incubada a 37 °C por 30 minutos e armazenada em freezer a -20 °C até a análise.

4.3.2 Extração de RNA Total.

Com o objetivo de se obter ácidos nucleicos de representantes da comunidade bacteriana endofítica metabolicamente ativos, foram feitas extrações de RNA total das amostras do colmo do milho, como segue.

Aproximadamente 1 g das amostras foi macerado em nitrogênio líquido até a sua granulação adequada (aspecto de talco) e foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 2 mL, previamente gelados em nitrogênio líquido e devidamente

identificados. Os tubos foram levados para uma capela de exaustão para adição de 1 mL do reagente RNA-Solv Reagent (Omega Bio-tek) em cada um dos tubos. Homogeneizaram-se os tubos em vórtex por 1 minuto e centrifugou-se o material a 12.000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos, adicionaram-se 200 µL de clorofórmio e homogeneizou-se vigorosamente por inversão por 15 segundos. Incubaram-se os tubos por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugaram-se novamente as amostras por 15 minutos, 12.000 rpm e 4 °C. Transferiu-se o sobrenadante (fase aquosa) para novos tubos e adicionaram-se 0,5 volume de isopropanol para a precipitação do RNA. Os tubos foram homogeneizados por inversão, incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados as mesmas condições anteriores. Descartaram-se os sobrenadantes e lavaram-se os péletes de RNA formados com 1 mL de álcool 75%, centrifugando-os por 5 minutos, 7.500 rpm a 4 °C. Após a lavagem, o álcool foi descartado e os tubos foram deixados invertidos sobre papel absorvente por 20 minutos aproximadamente, até os péletes secarem. Ressuspenderam-se os péletes com 30 µL de água DEPC (Serva) e armazenaram-nas amostras em freezer a -20 °C até a análise.

4.3.3 Quantificação dos Extratos de DNA e RNA

Os extratos de DNA e RNA foram analisados em gel de agarose (Agarose UltraPure, Invitrogen) 1% em tampão TBE 1X [Tris base 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2,5 mM (pH 8,3)], adicionado de brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A corrida eletroforética foi realizada em cuba e conduzida, também em tampão TBE 1X, durante 45 minutos para DNA e 20 minutos para RNA, a 90 V constantes. Uma alíquota de 3 µL de cada amostra (tanto de DNA como de RNA) adicionada de 3 µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,025% e glicerol 50%) foi aplicada no gel. A quantificação das amostras de DNA foi feita por comparação com marcadores de DNA de fago λ (Invitrogen) nas concentrações conhecidas ($20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$; $86 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $185 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). O DNA e o RNA das amostras foram visualizados sob luz UV, no sistema de digitalização de imagem L-PIX (Loccus Biotecnologia).

A concentração de RNA de cada amostra foi determinada pela leitura da absorbância a 260 nm por espectrofotometria, assumindo que a densidade ótica (DO) igual a 1, neste comprimento de onda, corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução. Foram feitas diluições das amostras de RNA para leitura em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, utilizando-

se cubeta de quartzo, específica para esses comprimentos de onda. Para cada amostra, foi feita a razão da densidade ótica (DO) lida em 260 nm pela DO lida em 280 nm para verificar a pureza do extrato ($1,8 \leq x \leq 2$), que pode ser prejudicada pela presença de fenol ou proteínas.

4.3.4 Transcrição Reversa

Para a construção da biblioteca de DNAC o extrato de RNA total obtido das amostras vegetais foi transcrito em DNAC (DNA complementar). Primeiramente foi feita, em tubo de microcentrífuga, uma reação contendo 5 μL de tampão específico da enzima transcriptase reversa (na concentração de 10 x); 4 μL de desoxirribonucleotídeos (2,5 mM); 1 μL da enzima transcriptase reversa (M-Mulv reverse Transcriptase, 200 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, BioLabs) e 6,5 μL de água miliQ estéril. Esta reação foi reservada até a sua utilização. Em outros tubos, foram adicionados 500 ng da amostras de RNA já quantificadas; 2 μL do iniciador reverso 778r (o mesmo utilizado na reação de amplificação) e 9 μL de água miliQ estéril. Estes tubos foram submetidos a 80 °C por 3 minutos em termociclador e depois colocados rapidamente em gelo. A reação preparada com a enzima foi adicionada aos tubos (reação final foi de 25 μL) e estes foram levados ao termociclador por 1 h a 37 °C, adicionadas de 10 minutos a 65 °C, obtendo-se assim o DNA complementar (DNAC) a partir do RNA.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL 16S DAS AMOSTRAS DE DNA E DNAC

A diversidade total e metabolicamente ativa dos micro-organismos associados ao milho foi estudada pela construção de bibliotecas do gene 16S RNAr, respectivamente produzidas a partir de fragmentos de DNA ou de DNAC conforme descrito acima, e pela análise filogenética das sequências obtidas.

Para a construção das bibliotecas, as amostras de DNA e DNAC foram utilizadas nas reações de amplificação (PCR) do gene 16S RNAr, utilizando-se iniciadores com sequências disponíveis na literatura, desenhados para o domínio Eubacteria (Tabela 4). Os pares de iniciadores escolhidos para amplificação das amostras de DNA foram 27f/1492r, para primeira reação de PCR e 27f/518r, para a segunda reação, abrangendo segmentos de aproximadamente 1.400 e 400 pb, respectivamente. Para a amplificação do DNAC foi realizada somente uma reação de PCR com o par de iniciadores 27f/778r, amplificando um

fragmento de 700 pb aproximadamente. A Tabela 5 mostra a sequência de nucleotídeos de cada iniciador utilizado.

Tabela 5 - iniciadores utilizados para as reações de amplificação do gene 16S RNAr.

Iniciador	Sequência	Referência
27f (forward)	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Gurtler e Stanisich 1996
778r (reverse)	5' AGG GTA TCT AAT CCT GTT TGC	Rosch e Bothe 2005
1492r (reverse)	5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT	Gurtler e Stanisich 1996
518r (reverse)	5' ATT ACC GCG GCT GCT GG	Muyzer et al. 1993

Fonte: GURTLER e STANISICH (1996).; MUYZER et al. (1993).; ROSCH e BOTHE (2005).

A escolha dos pares dos iniciadores utilizados neste trabalho foi feita a partir de uma triagem inicial, onde foram testados diferentes pares de iniciadores dirigidos para sequências do gene 16S RNAr. Foram avaliados os seguintes pares de iniciadores: 27f/778r; 63f/778r; 338f/778r; 27f/518r; 63f/518r; 27f/1492r; 63f/1492r; 338f/1492r e Y1/Y2; estas reações foram feitas utilizando-se como molde os extratos de DNA e DNAc obtidas a partir da transcrição reversa do RNA total, extraídos do milho. Esse teste inicial é importante, pois alguns autores obtiveram amplificação inespecífica usando iniciadores específicos para grupos bacterianos (SANTOS, 2008) e para leveduras (VALE, 2009) em amostras de DNA extraídas de frutos de café.

As PCRs, tanto para as amostras de DNA como para as amostras de DNAc, foram conduzidas em termociclador (Life Express, BIOER), contendo, em cada reação: 10-50 ng μL^{-1} de extrato de DNA, 1,5 μL de cada iniciador (20 pmol μL^{-1}), 0,2 μL de enzima *Taq* DNA polimerase (5 U μL^{-1}) (Invitrogen), 5 μL de tampão 10X Rnx Buffer (Invitrogen), específico da enzima *Taq* DNA polimerase, 1 μL de desoxiribonucleotídeos (10 mM) (Invitrogen), 1,2 μL de cloreto de magnésio (50 mM) (Invitrogen) e água miliQ estéril para um volume final de 50 μL . As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação (94 °C por 20 segundos), anelamento (57 °C por 2:30 minutos), extensão (72 °C por 2 minutos); e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Para as amostras de DNA, primeiramente se deu a amplificação com o par de iniciadores 27f/1492r. Os produtos desta primeira PCR foram usados como molde de DNA para a segunda PCR com o par de iniciadores 27f/518r, nas mesmas condições anteriores.

Para verificar a ocorrência da amplificação, alíquotas de 5 μL dos produtos da PCR, adicionadas de 3 μL de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,025% e

glicerol 50%) foram separadas em gel de agarose 1,5%, adicionado de brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). O marcador de tamanho molecular utilizado para comparação foi o 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

4.4.1 Purificação dos Produtos Amplificados

Os produtos obtidos da amplificação por PCR foram purificados utilizando-se o Kit “Combo PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

Primeiramente, os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,5%, nas mesmas condições anteriores. As bandas foram recortadas do gel e transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Os tubos com os fragmentos foram pesados em balança analítica e foram adicionados 3 volumes de tampão de solubilização para 1 volume do gel. Os tubos foram incubados a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho-maria por 10 minutos, homogeneizando-se por suaves inversões a cada 3 minutos, até a completa eluição do gel. Após a eluição, os tubos foram incubados por mais 5 minutos em banho-maria a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para otimizar a purificação, foi adicionado 1 volume de isopropanol ao gel dissolvido. Misturou-se por inversão e transferiram-se as soluções para as colunas de purificação (PureLinkR Clean-up Spin Column). Centrifugou-se à temperatura ambiente, 10.000 rpm por 1 minuto e descartaram-se os tubos coletores. Transferiram-se as colunas para novos tubos, adicionaram-se $650\ \mu\text{L}$ de tampão de lavagem, adicionado de etanol e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. Descartaram-se novamente os tubos coletores e transferiram-se as colunas para novos tubos. Centrifugou-se à máxima velocidade, à temperatura ambiente por 2 minutos para remover todo o resíduo do tampão de lavagem e descartaram-se os tubos coletores. Transferiram-se as colunas para tubos de eluição de 1,7 mL. Adicionaram-se $50\ \mu\text{L}$ de tampão de eluição [Elution Buffer - 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)], incubaram-se por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugaram-se as colunas em máxima velocidade por 2 minutos.

4.5 CLONAGEM

A clonagem é necessária para a construção de bibliotecas de clones de genes, que serão utilizados no sequenciamento. Diante disso, os fragmentos 16S DNAr, amplificados por PCR, foram clonados, de forma aleatória, utilizando o kit comercial “TA Cloning Kit” (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

4.5.1 Reação de Ligação

Imediatamente após a obtenção e purificação dos fragmentos amplificados pela PCR, foi feita a reação de ligação com o vetor pCR®2.1 [25 ng μL^{-1} em Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM (pH 8)]. Adicionaram-se em um microtubo de 200 μL : 1 μL de tampão de ligação 10X [Tris-HCl 60 mM (pH 7.5); MgCl_2 60 mM; NaCl 50 mM; albumina sérica bovina 1 mg mL^{-1} ; β -mercaptoethanol 70 mM; ATP 1 mM; ditiotretitol 20 mM e espermidina 10 mM], 1 μL da enzima de ligação T4 DNA ligase (4 U μL^{-1}), 2 μL do vetor plasmidial e 6 μL do produto da PCR. A reação foi deixada “overnight” a 4 °C e armazenada em freezer a -20 °C até ser utilizada na transformação.

4.5.2 Obtenção de Células Competentes

Primeiramente, foram obtidas colônias isoladas, a partir de estoque em glicerol, da bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH5 α (cedida gentilmente pelo Laboratório de Genética Molecular de Fungos - GENOPAR, Prof. Dra. Maria H. P. Fungaro), em placas com ágar Luria Bertani (LB) [Tryptona 1%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 1% e ágar 15 g mL^{-1} (pH 7)]. Uma colônia foi repicada em tubo de vidro com 10 mL de meio LB líquido e crescida em mesa agitadora, a 37 °C e 200 rpm, durante 18 horas, para a obtenção de um pré-inóculo. Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi transferida para um erlemeyer com 100 mL de meio LB líquido, e crescida nas mesmas condições anteriores, até o início da fase de crescimento exponencial (aproximadamente 2 horas e 30 minutos), onde verificou-se, em espectrofotômetro, que a densidade ótica (DO) a 550 nm, foi de 0,4 a 0,6 de absorbância.

Assepticamente, transferiram-se as células para 2 tubos Falcon (50 mL) pré-resfriados em gelo onde foram mantidos durante 10 minutos. Centrifugaram-se os tubos a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se cada pélete com 10 mL de CaCl_2 0,1 M gelado e mantendo-os em gelo por mais 15 minutos. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições anteriores, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se os péletes em 1 mL de CaCl_2 0,1 M gelado. As células competentes foram obtidas sempre que seria feita a transformação.

4.5.3 Transformação das Células Competentes

Em tubos tipo Falcon (15 mL) foram adicionados 10 µL da reação de ligação (item 4.5.1) e 200 µL das células de *E. coli* DH5α competentes (item 4.5.2). Misturaram-se gentilmente e incubaram-se os tubos no gelo por 30 minutos. Transferiram-se os tubos para um banho a 42 °C, onde foram mantidos por 90 segundos sem agitar. Rapidamente, os tubos foram transferidos para o banho de gelo e incubados por 2 minutos. Adicionaram-se 800 µL de meio S.O.C (Tryptona 2%; Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM e glucose 20 mM), misturaram-se suavemente e incubaram-os em mesa agitadora por 1 hora, 200 rpm e 37 °C. Após 1 hora de crescimento, 200 µL do cultivo celular foram espalhados, com alça de Drigalsky, em placas com meio LB com 50 µg mL⁻¹ de ampicilina (Inlab), X-gal [5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo] (80 µg mL⁻¹) e IPTG [isopropiltio-β-D-galactosídeo] (200 µg mL⁻¹) (Sigma). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas para o crescimento das células transformadas.

4.5.4 Crescimento e Estoque dos Clones

O IPTG utilizado na placa para o crescimento das células transformadas induz a produção de galactosidase funcional, uma enzima que cliva o composto X-Gal, resultando em um metabólito de coloração azul. Isso acontece quando não ocorreu a ligação do inserto (fragmento de DNA) ao plasmídeo. Quando o inserto se liga ao plasmídeo, ele se insere na região de codificação para galactosidase (*lacZ*), inibindo sua produção e assim, não ocorre a clivagem do composto X-Gal e as colônias transformantes crescem com sua coloração normal (branca).

Os clones (colônias brancas), foram então coletados com palitos esterilizados e depositados em microplacas com 96 poços, contendo 1 mL de meio LB líquido, adicionado de ampicilina 50 µg mL⁻¹. As microplacas foram seladas com filme adesivo e cada poço foi perfurado com agulha estéril para facilitar a aeração. Incubou-se a microplaca em mesa agitadora a 31 °C e 320 rpm, por 22 horas.

Após o cultivo, 100 µL da cultura da cada poço foram transferidos para uma microplaca de estoque (96 poços), adicionados de 100 µL de glicerol 40%. As microplacas foram seladas com filme adesivo e estocadas em freezer a -20 °C. Os 900 µL de cultivo restante foram utilizados na preparação de plasmídeos para o sequenciamento.

4.6 SEQUENCIAMENTO

4.6.1 Extração de DNA Plasmidial

O DNA plasmidial dos clones selecionados foi isolado por procedimento de “miniprep” (SAMBROOK et al., 1989). Após o período de crescimento (item 4.5.4), os 900 μL restantes do cultivo em microplaca foram transferidos para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL e centrifugados por 6 minutos, a 4.000 rpm a 10 °C. Descartou-se o sobrenadante, invertendo-se os tubos sobre papel absorvente e adicionaram-se 200 μL de GET [glicose 20% filtrada; EDTA 0,5 M (pH 8,0); Tris-HCl 1 M (pH 7,4) e água]. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 minutos para ressuspender as células e centrifugados por 9 minutos, 4.000 rpm a 10 °C. Descartou-se o sobrenadante e secaram-se os tubos em papel absorvente. Adicionaram-se 65 μL de GET, contendo 10 mg mL^{-1} de RNase. Agitou-se em vórtex novamente e adicionaram-se 65 μL de NaOH 0,2 N/SDS 1%. Misturou-se a solução 5 a 10 vezes por inversão e incubaram-se os tubos por 10 minutos a temperatura ambiente. Adicionaram-se a cada tubo, 60 μL de acetato de potássio 3M (KOAc) (estocado a 4°C), misturou-se 10 vezes por inversão e incubou-se por 10 minutos no gelo. Para separar os debris celulares, centrifugaram-se os tubos a 14.000 rpm, por 3 minutos e 4 °C. Transferiu-se todo o volume do sobrenadante (evitando-se os debris celulares) para tubos novos e estéreis, adicionaram-se 110 μL de isopropanol e misturou-se 10 vezes por inversão. Centrifugou-se por 45 min, 4.000 rpm, 4 °C e descartou-se o sobrenadante (invertendo-se os tubos sobre papel absorvente). Os péletes formados foram lavados com 200 μL de etanol 70% gelado, centrifugando-se por 5 minutos, 4.000 rpm a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante, secaram-se os tubos sobre papel absorvente e pulsou, 900 rpm, a 4 °C. Os tubos foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período, ressuspendeu-se o DNA plasmidial com 30 μL de água MilliQ e deixou-se em temperatura ambiente “overnight” para homogeneizar. Os tubos foram armazenados em freezer a -20 °C até a realização do sequenciamento.

4.6.2 Restrição e Quantificação do DNA Plasmidial

O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm (NanoDrop 2000 Spectrofotometer, Thermo Scientific). Para confirmar a presença do inserto nos plasmídeos extraídos, foi feita a digestão do produto da miniprep com a enzima EcoR I (Invitrogen), que corta o plasmídeo em dois sítios específicos (5'-G↓AATT C-3'/3'-C

TTAA↑G-5’), liberando o inserto. A digestão ocorreu da seguinte forma: adicionaram-se 5 µL do DNA plasmidial em microtubos de 100 µL, 1,5 µL de tampão 10X Buffer H [Tris-HCl 500 mM (pH 7,5); MgCl₂ 100 mM; Ditioneitol (DTT) 10 mM e NaCl 1 mM], 0,5 µL da enzima de restrição (EcoR I) e água miliQ para 15 µL de reação. A reação foi incubada a 37 °C em termociclador por 1 hora e a digestão foi verificada em gel de agarose 1%, adicionado de brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). O marcador de tamanho molecular utilizado para comparação foi o 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

4.6.3 PCR para Sequenciamento

Parte do sequenciamento foi realizado no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR, Curitiba-PR) e parte foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embra-Soja (Londrina-PR).

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems), em microplacas de 96 poços, utilizando o kit “DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism”, seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados em cada poço, 200 a 500 ng de DNA; 0,5 µM do oligonucleotídeo iniciador 27f; 1 µL do terminador Big Dye; 2 µL de tampão Save Money [Tris-HCl 400 mM (pH 9) e MgCl₂ 10 mM] e água miliQ para 10 µL de reação. As condições da PCR foram: 1 ciclo de 96 °C por 1 minuto e 30 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 58 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos.

4.6.4 Precipitação das Reações de Sequenciamento

Após a amplificação, o DNA foi precipitado, adicionando-se 10 µL de água miliQ; 2 µL de acetato de amônio e 3 x o volume de etanol absoluto a cada poço. Centrifugou-se a microplaca a 3.500 rpm e 20 °C, por 45 minutos (Centrífuga 5810 R, Eppendorf). Descartou-se o sobrenadante e secou-se a placa sobre papel absorvente. O DNA sedimentado foi lavado com 80 µL de etanol 70%, centrifugando-se por mais 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, deixou-se a placa secar à vácuo por 40 minutos e ressuspendeu-se o DNA com 10 µL de formamida.

4.6.5 Sequenciamento

O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems, German).

4.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Todas as seqüências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com base em seqüências depositadas no banco de dados de gene ribossomais disponíveis no “Ribosomal Database ProjectII” (RDPII) (<http://www.rdp.cme.msu.edu>) através do programa “Classifier” e “Sequence Match”. O RDP obtém as seqüências de RNAr mensalmente a partir do Banco de dados de Sequência InterNacional (“InterNATIONAL Nucleotide Sequence Database”: GenBank/EMBL/DDBJ). Essas seqüências são alinhadas com seqüências gerais de RNAr bacteriano através de um modelo que incorpora informações sobre a estrutura secundária da molécula aumentando a confiabilidade (FAORO, 2006). O RDP possui também um sistema de classificação taxonômica (“*RDP Hierarchy*”) que segue a proposta do Manual Bergeys (GARRITY et al., 2002) no qual os principais níveis taxonômicos, em ordem decrescente, são: Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie.

As seqüências foram editadas manualmente no programa “BioEdit Sequence Alignment Editor”, e alinhadas utilizando o programa para alinhamentos múltiplos ClustalX 1.83 (THOMPSON et al., 1997). Após o alinhamento, foram construídas duas árvores filogenéticas, uma para as seqüências obtidas na biblioteca de DNA e outra para as seqüências da biblioteca de DNAc. O programa utilizado para a construção e edição das árvores foi o MEGA 5 (“Molecular Evolutionary Genetics Analysis”). O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições.

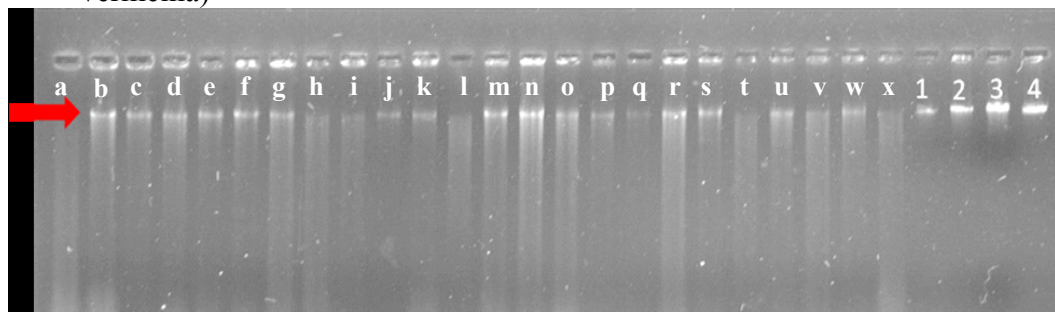
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DO COLMO DE MILHO

O protocolo utilizado para a extração de DNA total das amostras de colmo de milho, a fim de se obter representantes de bactérias endofíticas associadas à planta, foi aplicado com sucesso, pois foram obtidos extratos de DNA da maioria das amostras, em quantidades e qualidades satisfatórias (pouca fragmentação), conforme observação após eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Em algumas amostras não foi verificada a presença de bandas (não houve extração do DNA) e também verificou-se uma variação na quantidade e qualidade dos extratos de DNA entre as amostras (Figura 2). As avaliações quantitativas realizadas por comparação do perfil eletroforético das amostras com o perfil de amostras contendo concentrações conhecidas do fago λ , demonstraram que os extratos de DNA apresentaram uma concentração entre 20 e 40 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

De acordo com PURDY (2005), quando são realizadas extrações de DNA total de um determinado ambiente, para a construção de bibliotecas metagênicas, deve-se levar em consideração que: o extrato pode conter amostras de DNA que representam vários micro-organismos associados ao ambiente; o DNA extraído não pode estar degradado, já que DNA muito fragmentado pode causar a formação de produtos quiméricos na PCR e; o DNA deve estar livre de substâncias contaminantes, como polissacarídeos e partículas vegetais, que podem interferir no processo de inserção dos fragmentos no vetor de clonagem.

Figura 2- Perfil eletroforético de 24 amostras de DNA extraídas do colmo do milho (seta vermelha)



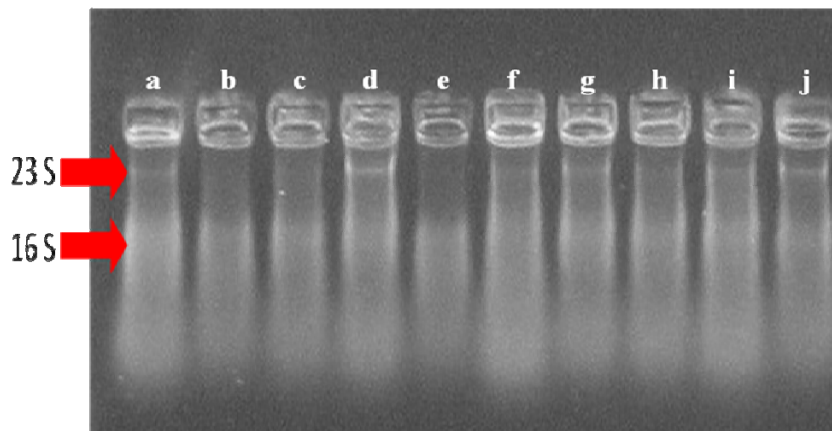
Canaletas a – x: amostras de DNA total extraído da parte interna de colmos de plantas de milho com 30 dias de plantio. Canaletas 1 – 4: padrões quantitativos para DNA contendo concentrações crescentes de fago λ (Invitrogen); 1) 20 $\text{ng DNA } \mu\text{L}^{-1}$; 2) 40 $\text{ng DNA } \mu\text{L}^{-1}$; 3) 86 $\text{ng DNA } \mu\text{L}^{-1}$; 4) 185 $\text{ng DNA } \mu\text{L}^{-1}$.

Fonte: A autora (2012).

5.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE COLMO DE MILHO

A integridade do RNA total extraído das amostras do colmo de milho foi conferida por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A presença de duas bandas no gel foi considerada como indicativo da integridade das subunidades do RNA ribossomal (Figura 3). A quantificação e a pureza dos extratos de RNA foi verificada em espectrofotômetro, a partir dos valores de absorvância a 260 nm e da razão das absorvâncias em 260/280 nm, respectivamente. O valor adequado para um bom grau de pureza para extratos de RNA apresenta uma razão de absorvância entre 1,8 e 2,0. A concentração média dos extratos ficou entre 500 e 1000 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, e todas as amostras apresentaram razão das absorvâncias com os valores desejados. Diante disso, pode-se dizer que o protocolo utilizado para extração de RNA total foi adequado, fornecendo extratos em quantidade e qualidade satisfatórias.

Figura 3 - Perfil eletroforético de 10 amostras de RNA total extraídas diretamente do colmo de milho.



As setas vermelhas indicam as subunidades ribossomais 23S e 16S. Canaletas: a-j: amostras de RNA total extraídas diretamente do colmo de milho.

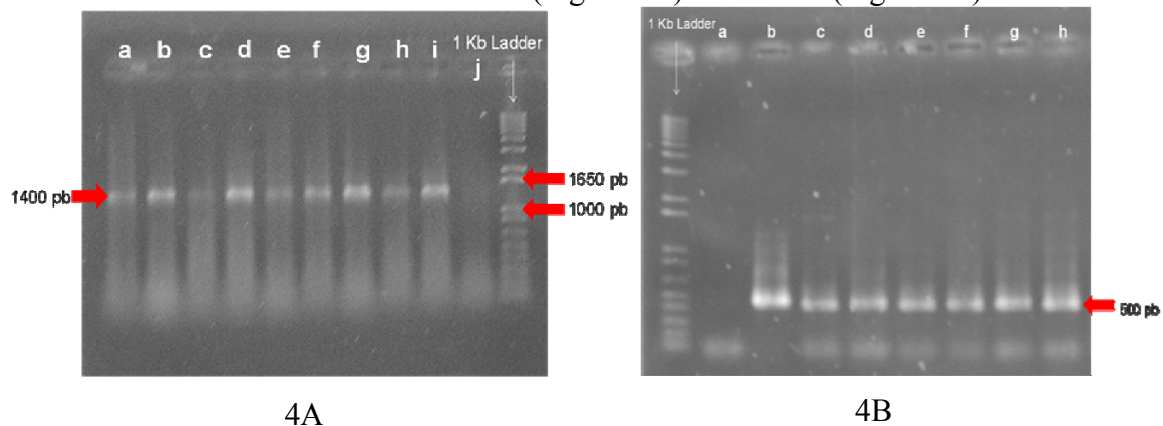
Fonte: A autora (2012).

5.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RNAR DAS AMOSTRAS DE DNA E DNAC

A PCR para amplificação do gene 16S RNAr a partir dos extratos de DNA apresentaram maior regularidade de amplificação quando realizada com os pares de iniciadores 27f/1492r e 27f/518r (Figura 4), produzindo fragmentos de aproximadamente, 1.400 e 500 pb, respectivamente. Por outro lado, quando foram utilizadas as amostras de DNAC, obteve-se maior regularidade de amplificação com o par de iniciadores 27f/778r (Figura 5), sintetizando fragmentos de 700 pb aproximadamente. Como o vetor utilizado na

clonagem comporta fragmentos de 400 a 700 pb, para as amostras de DNA foram realizadas duas PCRs: a primeira reação foi realizada com o par de iniciador 27f/1492r, utilizando-se os extratos de DNA do milho como molde, e o produto de PCR desta primeira reação foi utilizado como molde para a segunda reação, onde se utilizou o par de iniciador 27f/518r, produzindo assim fragmentos com tamanho adequado para clonagem e para a construção das bibliotecas metagenômicas.

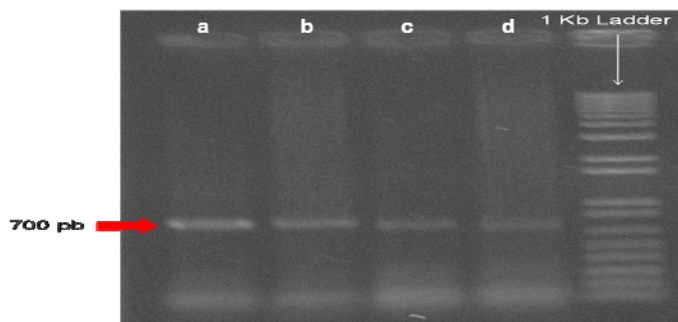
Figura 4- Perfil eletroforético dos produtos de PCR das amostras de DNA, amplificadas com os iniciadores 27f/1492r (Figura 4A) e 27f/518r (Figura 4B).



Canaletas a-j (Figura 4A): produtos de PCR das amostras de DNA, amplificadas com os iniciadores 27f/1492r. Canaletas a-h (Figura 4B): produtos de PCR das amostras de DNA, amplificadas com os iniciadores 27f/518r.

Fonte: A autora (2012).

Figura 5 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das amostras de DNAC



Amplificadas com os iniciadores 27f/778r (700 pb, aproximadamente). Canaletas a-d: produtos de PCR das amostras de DNAC, amplificadas com os iniciadores 27f/778r.

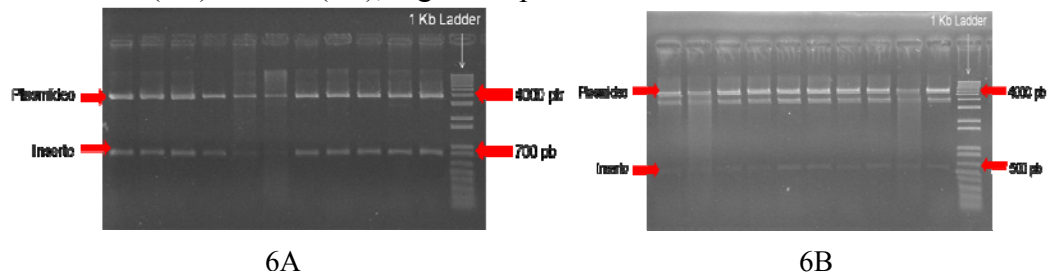
Fonte: A autora (2012).

5.4 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE DNA E DNAC

A construção das bibliotecas de DNA e DNAC não seguiu o cronograma do projeto, devido a vários problemas de ordem técnica e material enfrentados no decorrer dos experimentos. A otimização das reações de clonagem exigiu um tempo maior do que o

previsto, principalmente pela baixa eficiência da transformação a partir dos produtos de amplificação de alguns tratamentos, e a amplificação inespecífica de seqüências ribossomais de cloroplastos e mitocôndrias. As bibliotecas de DNA e DNAc construídas e sequenciadas até o momento não compreendem todos os tratamentos previstos. Foi feita uma avaliação qualitativa dos insertos clonados, a partir da extração diferencial do DNA plasmidial dos clones (miniprep) e análise de restrição dos plasmídeos obtidos com a enzima EcoRI, visualizados em gel de agarose 1%. Foi possível verificar que o perfil de restrição dos clones analisados apresentavam insertos correspondentes ao fragmento do gene 16S RNAr amplificado (Figura 6).

Figura 6- Análise em gel de agarose 1% do miniprep de clones aleatórios da biblioteca de DNAc (6A) e DNA (6B), digeridos pela enzima EcoRI.



Fonte: A autora (2012).

5.5 SEQUENCIAMENTO

Foram sequenciados 952 clones para a biblioteca de DNA e 141 clones para a biblioteca de DNAc. Os clones da biblioteca de DNA representam os tratamentos A0I0, A2I0, A0I1, A2I1, A0I3 e A2I3 e os clones da biblioteca de DNAc representam os tratamentos A0I3 e A2I3. Após os processos de análises da qualidade das seqüências, foram obtidas 683 seqüências da biblioteca de DNA e 87 da biblioteca de DNAc, as quais foram analisadas pelo programa *Bellerophon* para verificar a presença de quimeras, que não foram encontradas em nenhuma das bibliotecas.

Moléculas quiméricas são formadas por seqüências de mais de uma bactéria e podem constituir em grande problema nos trabalhos que visam a amplificação do gene 16S RNAr a partir de uma mistura de DNA genômico de várias espécies. Quando comparadas com o banco de dados, as seqüências dessas moléculas podem ser identificadas como uma espécie nova não classificada, sugerindo a presença de um organismo inexistente. A principal causa da formação de moléculas quiméricas é a presença de fitas simples de DNA terminadas prematuramente, especialmente nos ciclos finais da PCR, que reanelam a uma fita de DNA

diferente gerando um fragmento constituído por duas ou mais sequências, e que podem ser amplificados nos ciclos de PCR subsequentes (PAABO et al., 1992). Desta forma, a utilização de programas computacionais que buscam por padrões ou assinaturas de genes, como o programa *Bellerophon* que identifica sequências quiméricas a partir de alinhamentos múltiplos de sequência, são imprescindíveis para garantir a qualidade dos resultados obtidos em estudos de sequenciamento de bibliotecas obtidas a partir de extratos de ácidos nucleicos de amostras complexas, como as obtidas neste trabalho.

5.5.1 Análise das Sequências da Biblioteca de DNA

Após a verificação da ausência de sequências quiméricas, todas as sequências obtidas das duas bibliotecas foram submetidas ao classificador do banco de dados de sequências de 16S DNAr do RDP II (“Ribosomal Data Project” - www.rdp.cme.edu), através dos programas “Classifier” e “Sequence Match”. Enquanto o “Sequence Match” realiza a comparação com o banco de dados completo, incluindo sequências de 16S DNAr de organismos ainda não classificados ou descritos, o “Classifier” realiza a comparação com o banco de dados que contém sequências de 16S DNAr de organismos já descritos, ou seja, que possuem uma sólida análise taxonômica (FAORO, 2006).

Do total de 683 sequências obtidas a partir da biblioteca de DNA, quase 57 % (395 sequências) apresentaram elevado grau de similaridade com sequências de DNA mitocondrial ou de cloroplastos. Este fato foi um dos grandes problemas encontrados neste trabalho, e sua ocorrência provavelmente está relacionada à hipótese de que os cloroplastos e as mitocôndrias modeRNAs teriam se originado em um evento endossimbiótico, no caso dos cloroplastos um endossimbiótico fototrófico (VIANEZ JUNIOR, 2005). Mitocôndrias e cloroplastos possuem ribossomos do tipo procarioto (sendo inclusive inibidos por antibióticos que atuam na função dos ribossomos bacterianos), contém pequenas quantidades de DNA circular covalentemente fechados (característica típica nos procariotos) e mostram sequências de RNA ribossomal típica de certas bactérias (MARGULIS, 1984). TARAZI (2010) ressalta que os cloroplastos ainda possuem exemplares do gene 16S RNAr remanescentes e que estes podem competir com a amplificação do DNA bacteriano.

As outras 288 sequências da biblioteca DNA representam bactérias, com um índice de confiança variável entre 97 a 100 %. Grande parte das sequências (quase 63 %) pertencem ao filo Cyanobacteria, gênero *Streptophyta*. Aproximadamente 37 % das bactérias encontradas são pertencentes ao filo Proteobacteria, onde quase 27,5 % são pertencentes ao

gênero *Novosphingobium*, 7 % ao gênero *Sphingomonas*, 1,5 % ao gênero *Sandaracinobacter* e 1 % a Sphingomonadaceae ainda não classificadas. Além disso, foi encontrado um clone de Gammaproteobactérias ainda não classificadas; e um clone pertencente ao gênero *Limnohabitans*. A Tabela 6 mostra o número de bactérias encontradas em cada tratamento. Todas as bactérias encontradas estão descritas na Tabela 10 do APÊNDICE.

Tabela 6 - Número de clones encontrados em cada tratamento na biblioteca de DNA.

Gênero mais provável	Filo mais provável	Tratamentos*						Total
		A0I0	A2I0	A0I1	A2I1	A0I3	A2I3	
<i>Streptophyta</i>	Cyanobacteria	22	16	32	69	41	1	181
<i>Novosphingobium</i>	Proteobacteria	-	-	1	-	21	57	79
<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria	-	-	-	-	7	12	19
<i>Sandaracinobacter</i>	Proteobacteria	-	-	-	-	-	4	4
Sphingomonadaceae não classificada	Proteobacteria	-	-	-	-	1	2	3
Gammaproteobacterias não classificada	Proteobacteria	-	-	1	-	-	-	1
<i>Limnohabitans</i>	Proteobacteria	-	-	-	-	1	-	1
Total		22	16	34	69	71	76	288

*Tratamentos: A0I0: sem aplicação de N e sem inoculação; A2I0: com 160 Kg ha⁻¹ de N aplicado e sem inoculação; A0I1: sem aplicação de N e inoculação em turfa na semente; A2I1: com 160 Kg ha⁻¹ de N aplicado e inoculação em turfa na semente; A0I3: sem aplicação de N e inoculação líquida na pós-emergência e A2I3: com 160 Kg ha⁻¹ de N aplicado e inoculação líquida na pós-emergência.

Fonte: A autora (2012).

Diante destes resultados, verificou-se que quando foi levada em consideração somente a presença do adubo nitrogenado na cultura, sem considerar o inoculante diazotrófico (tratamentos A0I0 e A2I0), o número e a diversidade de representantes bacterianos encontrados foram baixos. A predominância de bactérias representantes do filo Cyanobacteria sugere que esses micro-organismos são endofíticos naturais no milho, já que também foram encontrados em associação com a cultura quando esta não foi tratada com adubo e inoculante. Os resultados apresentados para os tratamentos A0I1 e A2I1 indicaram um aumento no número de representantes bacterianos, e, embora a predominância ainda seja do filo Cyanobacteria, foram encontradas uma proteobacteria e uma gammaproteobacteria na biblioteca, o que indica que a presença de um inoculante com *Azospirillum brasilense* favoreceu a presença de outras bactérias endofíticas na cultura.

As cianobactérias têm sido encontradas em muitos ambientes (água doce, água salgada e solo), sendo um dos maiores grupos de procariotos fotossintetizantes capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (MARCHESAN, 2007). A fixação ocorre em células

especializadas, denominadas heterocistos, onde a enzima nitrogenase catalisa a conversão do N_2 em amônia, tornando o N disponível para reações biológicas (RAVEN et al., 2001). Desta forma, as cianobactérias contribuem significativamente para a fertilidade do solo (VAISHAMPAYAN et al., 1998), constituindo-se em uma alternativa promissora que incrementa a biodiversidade do solo e melhora sua estrutura pós-colheita (MULE et al., 1999). Além disso, KURITZ (1999) verificou que algumas espécies também são hábeis em degradar agroquímicos, e ENANY e ISSA (2000) recomendam o uso de cianobactérias para purificação de águas contaminadas por metais pesados. Algumas cianobactérias têm a capacidade de colonizar plantas endofiticamente, o que tem gerado interesse em estudar tais micro-organismos com alta capacidade de fixar nitrogênio e estabelecer associações com plantas (SÁNCHEZ, 2011). Estudos com inoculantes de cianobactérias em arroz têm demonstrado aumento na produtividade. Porém, segundo IRISARRI et al. (2001), o potencial do uso das cianobactérias no ecossistema da produção de arroz depende da sua habilidade para multiplicar, colonizar e sobreviver. Segundo MACHADO e MATTOS (2001), fatores como luminosidade, temperatura e pH do meio influenciam no desenvolvimento das cianobactérias. No entanto, estudos da associação entre cianobactérias e a cultura do milho ainda não foram realizados e os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para posteriores estudos sobre o potencial destes micro-organismos para a promoção do crescimento na cultura de milho.

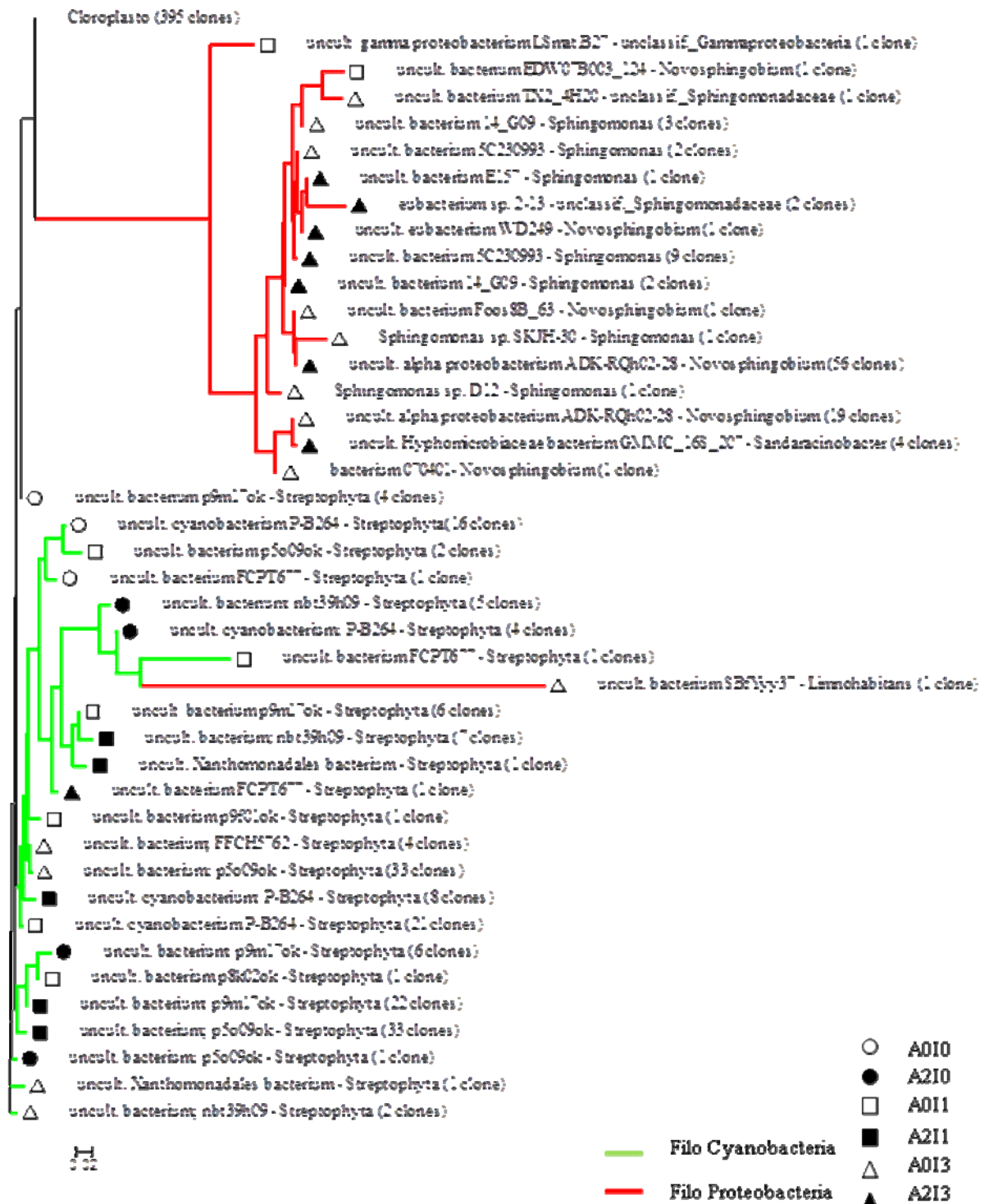
Diferentemente dos tratamentos anteriores, os clones obtidos dos tratamentos A0I3, sem nitrogênio e com inoculação líquida na pós-emergência da planta, e A2I3, com aplicação de nitrogênio e inculante na pós-emergência, apresentaram maior diversidade de bactérias, com predominância de proteobactérias do gênero *Novosphingobium* e *Sphingomonas*. O tratamento A0I3 apresentou 71 clones e o tratamento A2I3 apresentou 77 clones, ambos com representantes do filo Proteobacteria e Cyanobacteria, o que indica que não houve diferenças contrastantes quanto ao número e diversidade de bactérias encontradas. No entanto, para o tratamento sem adição de nitrogênio, verificou-se uma maior predominância de cianobactérias, onde foram encontradas 41 sequências destes micro-organismos contra apenas 1 representante no tratamento com adição de nitrogênio.

A maior diversidade de bactérias para estes últimos tratamentos apresentados pode estar relacionada ao tipo de inoculação utilizada. A aplicação do inoculante líquido na pós-emergência da planta, possivelmente, pode ter sido menos eficiente que o inoculante em turfa, já que as bactérias diazotróficas ficam mais protegidas quando veiculadas em material sólido. Isso pode ter estimulado a presença de uma diversidade maior de bactérias

que podem trazer, mesmo que ainda não muito claro, algum tipo de benefício para a planta. Ainda não se sabe como micro-organismos dos gêneros *Novosphingobium* e *Sphingomonas* podem influenciar na produtividade do milho e desta forma, mais estudos devem ser realizados para a verificação do potencial destes gêneros de bactérias na agricultura. PEDRINHO et al. (2010) verificaram a influência da inoculação de bactérias do gênero *Sphingomonas*, isoladas de raízes de milho, na altura e massa seca da planta e constataram, para ambos, resultados comparáveis com a atividade do *Azospirillum* sp. na mesma cultura, concluindo que bactérias deste gêneros podem ser promissoras quanto à promoção do crescimento vegetal. A maior predominância de cianobactérias no tratamento A0I3, onde não houve aplicação de nitrogênio sugere que a falta de nitrogênio, tanto por adubo quanto pela baixa eficiência do inoculante, pode estimular a presença de organismos com potencial para a fixação do nitrogênio atmosférico, como as cianobactérias.

A árvore filogenética (filograma) gerada para a biblioteca de DNA (Figura 7) mostra o agrupamento das sequências por “neighbor-joining” e indica de qual tratamento cada clone foi obtido.

Figura 7 - Filograma das seqüências de 16S DNAr, amplificadas da biblioteca de DNA, indicando o nome completo das bactérias encontradas e o último nível taxonômico.



O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições. Todas as seqüências obtidas dos clones foram enumeradas (1 a 683). Os tratamentos foram indicados conforme a legenda da Figura. A abreviatura foi designada como Uncult., Uncultured.

A influência da adubação nitrogenada e da inoculação de bactérias diazotróficas na produtividade das plantas, por hectare, foram analisadas por SANTOS (2011) a partir do teste t com nível de 5 % de significância e estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Produtividade do milho em Mg ha^{-1} para os diferentes tratamentos.

Tratamento	Produtividade em Mg ha^{-1}
A0I0	6,2 c
A2I0	8,8 ab
A0I1	9,4 a
A2I1	8,6 ab
A0I3	7,8 b
A2I3	8,8 ab

Fonte: SANTOS (2011).

Como esperado, o tratamento controle A0I0, além de apresentar somente representantes de cianobactérias na biblioteca, mostrou uma baixa produtividade ($6,2 \text{ Mg ha}^{-1}$), possivelmente pela falta de nitrogênio disponível para a planta. Os tratamentos A2I1 e A2I3, com aplicação máxima de nitrogênio e com inoculação, além de apresentarem maior número e diversidade de bactérias na biblioteca, apresentaram valores semelhantes de produtividade ($8,6$ e $8,8 \text{ Mg ha}^{-1}$, respectivamente), superior ao tratamento controle. O tratamento A2I0, embora tenha tido a mesma dose de nitrogênio e uma produtividade semelhante aos outros tratamentos ($8,8 \text{ Mg ha}^{-1}$), apresentou baixo número de bactérias na biblioteca (todas cianobactérias), indicando que a falta de inoculante na presença do adubo nitrogenado pode diminuir a diversidade de bactérias presentes na cultura, ainda que se verifique a eficiência da adubação nitrogenada para a produtividade do milho. O tratamento A0I1, embora tenha apresentado um baixo número de representantes bacterianos, foi o tratamento que apresentou a maior produtividade ($9,4 \text{ Mg ha}^{-1}$), indicando então, que o inoculante em turfa apresentou maior eficiência na ausência de adubo nitrogenado. Já o tratamento A0I3, com inoculação em veículo líquido na pós-emergência da planta, resultou numa baixa produtividade, sendo superior somente ao tratamento controle ($7,8 \text{ Mg ha}^{-1}$). Desta forma, na ausência do adubo nitrogenado, independentemente da diversidade de micro-organismos presentes na cultura, a inoculação em veículo sólido na semente se mostrou mais eficiente que o veículo líquido na pós-emergência da planta.

5.5.2 Análise das Sequências da Biblioteca de DNAC

Das 87 sequências analisadas na biblioteca de DNAC, 4 eram sequências de cloroplastos. Todas as outras 83 sequências pertencem ao Domínio Bacteria, com um índice de confiança variável entre 97 a 100%. Foi encontrado somente um clone pertencente ao filo Gemmatimonadetes e um clone pertencente ao filo Cyanobacteria, todos os demais foram classificados como pertencentes ao filo Proteobacteria, classe das Alphaproteobacterias, ordem Sphingomonadales e família Sphingomonadaceae, ocorrendo diferenças somente nos gêneros. A Tabela 8 mostra o número de clones das bactérias encontradas para cada tratamento, os quais estão descritos na Tabela 10 do APÊNDICE.

Tabela 8 - Número de clones encontrados em cada tratamento na biblioteca de DNAC.

Gênero mais provável	Filo mais provável	Tratamentos		Total
		A0I3	A2I3	
<i>Streptophyta</i>	Cyanobacteria	1	-	1
<i>Novosphingobium</i>	Proteobacteria	23	33	56
<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria	16	5	21
<i>Sandaracinobacter</i>	Proteobacteria	1	1	2
<i>Gemmatimonas</i>	Gemmatimonadetes	1	-	1
<i>Blastomonas</i>	Proteobacteria	1	-	1
Proteobacteria não classifica	Proteobacteria	-	1	1
Total		43	40	83

*Tratamentos: A0I3: sem aplicação de N e inoculação líquida na pós-emergência e A2I3: com 160 kg ha⁻¹ de N aplicado e inoculação líquida na pós-emergência.

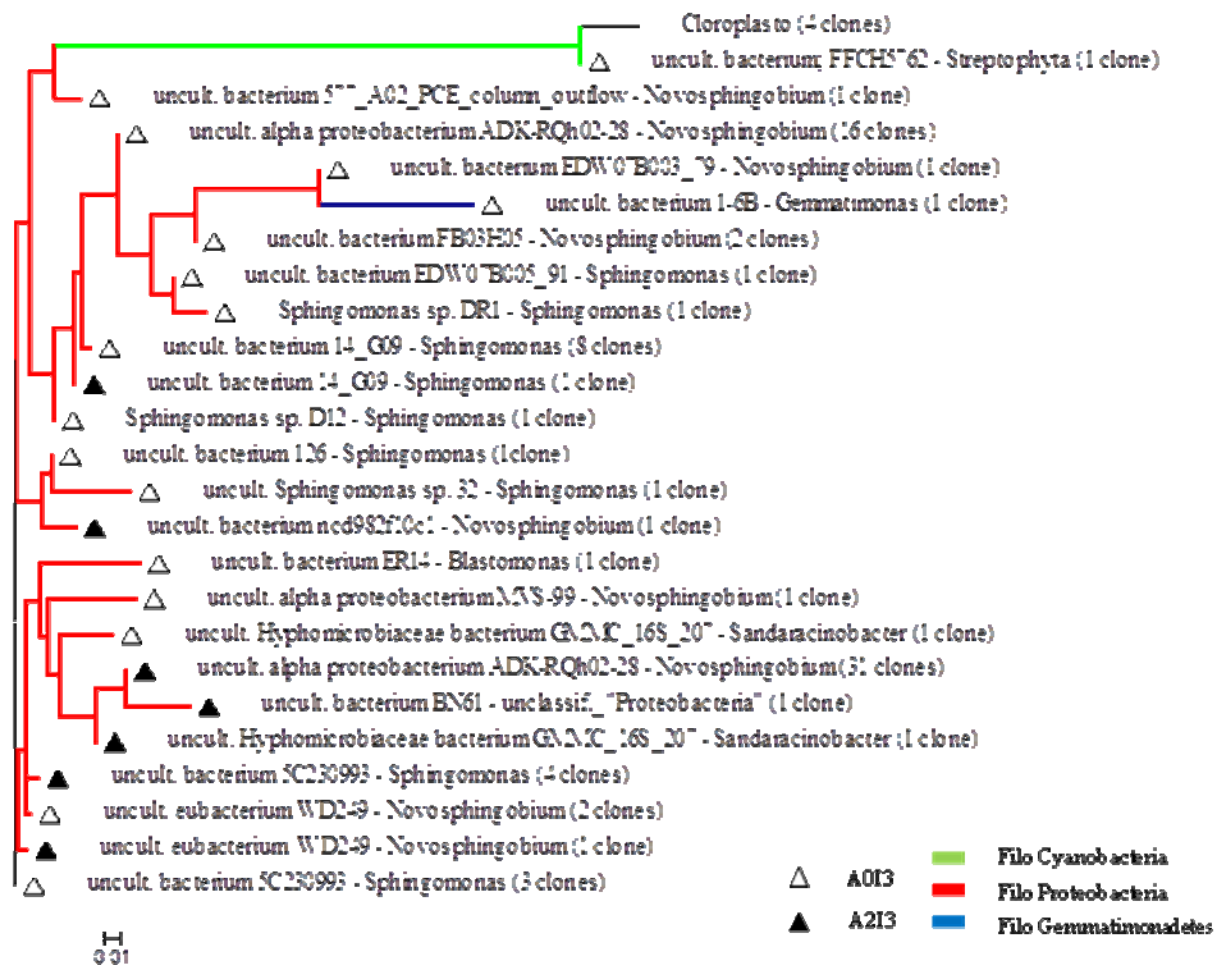
Fonte: A autora (2012).

Somadas, quase 89 % das bactérias encontradas foram dos gêneros *Novosphingobium* e *Sphingomonas*. Estirpes destes gêneros têm sido isoladas de uma variedade de ambientes, incluindo solos contaminados com produtos químicos, sedimentos, águas de rios e oceanos e tecidos vegetais, como folhas, flores e sementes de diversas famílias botânicas. Essa grande distribuição é decorrente da sua habilidade de utilizar uma larga escala de compostos orgânicos como fonte de carbono e sobreviver sob condições nutricionais limitadas (YABUCCHI e KOSAKO, 2005). Alguns autores acreditam que devido à capacidade de adesão (através de biofilmes) por longos períodos destas bactérias ao filoplano das espécies vegetais, estas conseguem infectar sementes e se dispersar ao longo da parte aérea das plântulas, tornando-se endofíticas (MORRIS et al., 1998; ELASRI e MILER, 1999). HASHIDOKO et al. (2006) e MANO et al. (2006) isolaram bactérias do gênero *Sphingomonas* não somente da palha, mas também de sementes de arroz esterilizadas superficialmente. No entanto, embora quantidades significativas destas bactérias tenham sido

encontradas em tecidos vegetais, informações sobre os benefícios gerados por essa interação ainda são escassos (VIDEIRA, 2008).

A árvore filogenética (filograma) gerada para a biblioteca de DNAC (Figura 10) mostra o agrupamento das sequências por “neighbor-joining” e indica sob qual tratamento cada clone estava submetido.

Figura 8 - Filograma das sequências de 16S DNAr, amplificadas da biblioteca de DNAC, indicando o nome completo das bactérias encontradas e o último nível taxonômico encontrado.



O método de construção foi calculado pelo algoritmo “Neighbor-Joining” com “bootstrap” de 1000 repetições. Todas as sequências obtidas dos clones foram enumeradas (1 a 83). Os tratamentos foram indicados conforme a legenda da Figura. A abreviatura foi designada como Uncult., Uncultured.

Comparando a diversidade de micro-organismos encontrados com o tipo de tratamento dos quais eles foram obtidos, verifica-se que não houve diferenças contrastantes entre os tratamentos A0I3, sem aplicação de nitrogênio e com inoculante líquido aplicado na pós-emergência da planta, e o tratamento A2I3, com dose de 160 kg/ha de nitrogênio e inoculante líquido na pós-emergência. O tratamento A0I3 apresentou 42 clones divididos em

6 gêneros e o tratamento A2I3 apresentou 40 clones divididos em 4 gêneros e ambos apresentaram os gêneros *Sphingomonas* e *Novosphingobium* como micro-organismos predominantes, indicando que estes são endofíticos predominantes e metabolicamente ativos na planta, já que a biblioteca de DNAc representa os genes que foram transcritos em RNA para serem expressos.

5.5.3 Comparação dos Resultados obtidos na Biblioteca de DNAc com a Biblioteca de DNA.

Na biblioteca de DNAc foram analisados somente os clones obtidos dos tratamentos A0I3 e A2I3. Desta forma, as comparações com os clones obtidos na biblioteca de DNA serão feitas considerando somente esses dois tratamentos. Na biblioteca de DNA foram obtidos 148 clones para os dois tratamentos analisados e na biblioteca de DNAc foram obtidos 83 clones. As duas bibliotecas apresentaram muitos representantes dos gêneros *Novosphingobium* e *Sphingomonas* em associação com o milho, o que sugere que tais bactérias, além de serem predominantes, são metabolicamente ativas no ambiente estudado. No entanto, o tratamento A0I3 (sem adição de nitrogênio) da biblioteca de DNA apresentou, em sua maioria, representantes de cianobactérias, o que não foi verificado na biblioteca de DNAc para o mesmo tratamento. Isto sugere que tais bactérias podem estar presentes quando a dose de nitrogênio está baixa, já que estas podem fixar nitrogênio atmosférico, porém não estavam metabolicamente ativas no momento da extração do RNA para a biblioteca de DNAc. Além dos gêneros *Novosphingobium* e *Sphingomonas*, a biblioteca de DNAc apresentou bactérias dos gêneros *Blastomona*; *Sandaracinobacter* e um clone pertencente a Proteobactérias não classificadas. A quantidade e a diversidade de clones obtidos para os dois tratamentos na biblioteca de DNAc não apresentaram resultados contrastantes. A biblioteca de DNA apresentou também, bactérias do gênero *Sandaracinobacter*, 1 clone de Gammaproteobactéria ainda não classificada; e um clone de *Limnohabitans*. Embora a diferença entre as duas bibliotecas seja discreta, a biblioteca de DNA apresentou maior quantidade e diversidade de micro-organismos endofíticos, o que já era esperado, já que a biblioteca de DNA abrange tanto os micro-organismos ativos metabolicamente como os não ativos no ambiente, ou seja, aqueles que não apresentam seus genes expressos. Diferentemente, NOGALES et al. (2001) encontraram maior diversidade de micro-organismos na biblioteca de DNAc, quando analisaram a comunidade bacteriana de solo contaminado com PCB (bifenil policlorado). Possivelmente, esse resultado está relacionado

com o ambiente analisado, já que em solo contaminado, predominam os micro-organismos metabolicamente ativos capazes de crescer nesses ambientes.

Embora tenha sido verificado o sucesso de inoculação com o *Azospirillum brasilense*, pelo aumento da produtividade da planta quando inoculada com a bactéria, não foi constatada a presença desta em nenhuma das bibliotecas. Possivelmente, o número de micro-organismos endofíticos associados ao milho não foi suficientemente amostrado para revelar a real diversidade bacteriana associada. Diante disso, é necessário reavaliar as estratégias atualmente adotadas para que se possam obter mais clones bacterianos endofíticos de milho e realizar o sequenciamento de um número maior de clones obtidos desta cultura para que seja possível uma melhor descrição da diversidade destas bactérias associadas à planta.

6 CONCLUSÕES

Tanto para a biblioteca de DNA como para de DNAc, foram encontrados muitos representantes bacterianos pertencentes ao filo Proteobacteria (gêneros *Sphingomonas* e *Novosphingobium*), o que sugere que estes micro-organismos são predominantes e metabolicamente ativos na cultura de milho. Além destes, a biblioteca de DNA apresentou um grande número de representantes do filo Cyanobacteria, o que indica sua associação natural com a cultura. Mesmo não tendo um conhecimento claro sobre a atividade destas bactérias na cultura do milho, estes resultados podem contribuir para estudos posteriores, a fim de se utilizar estes micro-organismos como possíveis promotores do crescimento vegetal nesta cultura.

Analisando a diversidade de bactérias endofíticas encontradas em cada um dos tratamentos e comparando com os resultados de produtividade, pode-se concluir que, na presença do adubo nitrogenado, a inoculação com diazotróficos aumenta a diversidade e o número de bactérias associadas ao milho, mesmo que de forma discreta. Na ausência do adubo nitrogenado, verificou-se diferenças quanto a diversidade de representantes bacteriano e a produtividade da cultura. As plantas inoculadas em veículo sólido na semente, embora tenham apresentado baixa diversidade de bactérias, demonstraram a maior produtividade entre todos os tratamentos enquanto as plantas inoculadas com veículo líquido na pós-emergência, embora tenham apresentado uma maior diversidade de representantes bacterianos, demonstraram menor produtividade entre os tratamentos.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentam uma avaliação parcial da diversidade de bactérias endofíticas associadas ao milho e representam uma base para estudos futuros, a fim de conhecer a comunidade bacteriana no ambiente e melhor estudar o seu potencial para a cultura de milho, bem como o impacto do uso de inoculantes sobre a microbiota endofítica nativa da cultura. No entanto, há necessidade de se reavaliar as estratégias atualmente adotadas para que seja possível uma melhor descrição da diversidade bacteriana endofítica associada ao milho.

REFERÊNCIAS

- AIT BARKA, E. et al. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. **Biological Control**, Orlando, v. 24, 2002. p. 135-142.
- ALBERGONI, L.; PELAEZ, V. Da Revolução Verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? **Revista de Economia**, v. 33, n. 1 (ano 31), p. 31-53, jan./jun. 2007. Editora UFPR.
- ALVES, B. R. J.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, 2003. p. 1-9.
- AMANN, R.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, 1995. p.143-169.
- AMORIM, E.P. da R.; MELO, I.S. de. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.565-568, 2002.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145–180, 2000.
- ANDREOTE, F. D. et al. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, 2006. p. 419-426.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 43, 2000.p. 447-451.
- ARAUJO, S. C. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. **Revista informações agronômicas**, Piracicaba, n.122, p.4–6, 2008.
- ASSUMPCÃO, L. C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de semente de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.5, 2009. p.503-510.
- AZEVEDO, J. L. et al. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. Em: **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Serafini et al (eds). EDUCS, 2002.
- BALDANI, V. L. D. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. In the rizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, n. 3, 1986. p. 35-46.
- BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.12, n. 4, 1980. p. 433-439.

BALDANI, J.I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Seropedica, n.5/6, v.29, 1997. p.911-922.

BARRETTI, P.B.; SOUZA, R. M. de; POZZA, E. A. Bacterias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibicao *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, 2008. p.731-739.

BARY, A. de. **Morphologie Physiologie der Pilze**. Flechten, und Myxomyceten. Vol. II. Holmeister's Handbook of Physiological Botany, Leipzig, 1866.

BASHAN, Y. et al. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, 2004. p. 521-577.

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

BOBATO, A. **Índice nutricional do nitrogênio: uma ferramenta para o diagnóstico do estado nutricional da cultura do milho**. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2006.

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

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 7, 1997. p. 2647-53.

CÂMARA, G. M. S. Inoculação das sementes de soja. In: CÂMARA, G. M. S. Soja: **Tecnologia de Produção**. Piracicaba: [s.n.], 1998, p. 278-293.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen fixing bacteria associated with sugar cane. **Plant Soil**, v.108, 1988. p.23-31.

CAVALLET, L.E. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidades de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. Tese de Doutorado. 2005. Universidade Federal de São Carlos, 2005.

CHABOT, R. et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, 1996. p. 2767-2772.

CHELIUS, M.K. & TRIPLETT, E.W. **The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L.** Microbiol. Ecol., 2001.p. 252-263.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, 2000. p.183–187.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **JouRNAl of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, 1997. p.302-307.

COURTOIS, S. et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, 2003. p.49–55.

CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extration of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, vol. 30, nº 8/9, 1998. p. 983-993.

DAMASCENO, R. G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. Tese de Mestrado. 2011. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2011.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature**, v.3, 2005. p.470-478.

DAWE, D. The potential role of biological nitrogen fixation in meeting future demand for rice and fertilizer. In: LADHA, J. K and REDDY, P. M. (eds). **The Quest for Nitrogen Fixation in Rice**. Proceedings of the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, 9-12 Aug. 1999, Los Baños, Laguna, Philippines. Makati City (Philippines): InteRNAtional Rice Research Institute. p1-9, 2000. 354 p.

DeLONG, E. F. Microbial population genomics and ecology: the road ahead. **Environmental Microbiology**, v. 6, 2004. p.875-878.

DINSDALE, E.A. et al. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v. 452, 2008. p. 629-633.

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

DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, 1992. p. 310-313.

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

DOBEREINER, J.; DAY, J.M. **Associative symbioses in tropical grasses**: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites, 1976.

DOBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova especie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v.1, p.261-272, 1958.

- DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; MCCULLY, M. E. Further evidence that the N₂ fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, 1995. p. 1843-1846.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 1, 13-15, 1991.
- DUARTE, J. de O. **Economia da produção**. In: CRUZ, J.C. (Ed.). Cultivo do milho. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007.
- DUARTE, T et al. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the indigenous bacterial community. **JouRNAI Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 32, 1998. p. 21-29.
- DUFFY, B. K. Competition: In: MALOY, O. C.; MURRAY, T. D. (Org.). **Encyclopedia of Plant Pathology**, New York, 2001. p. 243-244.
- EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-microbe interactions**, v. 12, 1999. p. 813-819.
- ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. Study of the response of biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, 1999.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA MILHO E SORGO**, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br>>. Acesso em: Ago. de 2008.
- EMBRAPA. **Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o agronegócio brasileiro: Cenários 2002-2012** / Embrapa , Secretaria de Gestão e Estratégia. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 92 p.
- EMBRAPA-MS. (2010). Acesso em 10 de Julho de 2011, disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/feranalise.htm>
- ENANY, A.E.E.; ISSA, A.A. Cyanobacteria as a biosorbent of heavy metals in sewage water. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 8., n. 2, 2000. p. 95-101.
- ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, v.44, p.139-144, 1998.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360.p.
- FAORO, H. **Determinação da Diversidade de Archaea e Bacteria da Mata Atlântica Paranaense**. Tese de Mestrado. 2006. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2006.
- FIGUEIREDO, M. V. B. et al. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Ed. Agrolivros. Guaíba, RS, 2008.
- FISHER, P.J., PETRINI, O., SCOTT, H.M.L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 122, 1992. p. 299-305.

- FUENTES-RAMÍREZ, L.E. et al. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, 1999. p.117-128.
- GARRITY, G. M.; WINTERS, A.; KUO, A. W.; SEARLES, D. B. Taxonomic outline of the prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, second edition, <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310>, 2002.
- GILLESPIE, D.E. et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, 2002. p.4301-4306.
- GLICK, B. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, 1995. p. 109-117.
- GURTLER, V.; STANISICH, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**. 142:3-16, 1996.
- GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, n. 3, 2001. p. 117-126.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, 1997. p.895-914.
- HALLMANN, J. et al. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, 1998. p. 925-937.
- HANDELSMAN, J.; et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry Biology**, Cambridge v. 5, 1998. p. 245-49.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, v.68, 2004. p.669-685.
- HASHIDOKO, Y. et al. Acid-tolerant *Janthinobacterium* sp. actively emitting N₂O from the Forest tropical peatland. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006.
- HEAD, I., J. R. SAUNDERS, AND R. W. PICKUP. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbiol. Ecol.** 35:1-21.
- HENNE, A.; SCHMITZ, R.A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, 2000. p.3113-3116.
- HOEFT, R. G. **Desafios para obtenção de altas produtividades de milho e soja nos EUA.** *Informações Agrônomicas*, Piracicaba, v. 104, n. 1, p. 1-4, 2003.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, 1998. p.4765-4774.

- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011.
- HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, 1998. p.278-285.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; van MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **JouRNAl of Bacteriology**, v.176, 1994. p.1913-1923.
- IAPAR. **Monitoramento Agroclimático do Paraná**. Londrina, 2007. Disponível em: <<http://200.201.27.14/Site/Sma/Index.html>>. Acesso em: 10 abr. 2007.
- IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias Endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2010.
- IBGE. **Estatística da Produção Agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201111comentarios.pdf> Acesso em: 6 Jan. 2011.
- IRISARRI, P. et al. Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen. **J. Biotechnol.**, Bielefeld, v. 91, p. 95-103, 2001.
- JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research** , v. 65, p. 197-209, 2000.
- KARTHIKEYAN, M. et al. Endophytic *Pseudomonas fluorencens* Endo2 and Endo35 induce resistance in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) to the pathogen *Macrophomina phaseolina*. **JouRNAl of Plants Interactions**, Abington, v. 1, 2005. p. 135-143.
- KAVINO, M. et al. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, 2007. p. 1087-1098.
- KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, 2000. p. 423-441.
- KEYSER, H. H. et al. Rhizobial ecology and technology, In: METTING, F. B. (Ed.) **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**, New York: Marcel Decker, 1992. P. 205-226.
- KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **JouRNAl of Applied Microbiology**, v.96, p.473-480, 2004.
- KURITZ, T. Cyanobacteria as agent for the control of pollution by pesticides and chlorinated organic compounds. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Munich, v. 85, 1999. p. 186-192.

- LODEWYCKX, C. et al. **Endophytic bacteria and their potential applications**. Crit. Rev. Plant Sci., 21:583-606, 2002.
- LORENZ, P.; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature**, v.3, 2005. p.510-516.
- MACHADO, A. T.; SANTILLI, J.; MAGALHÃES, R. **A agrobiodiversidade com enfoque agroecológico: implicações conceituais e jurídicas**. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 98 p.
- MARCHESAN, E. et al. Desempenho do arroz irrigado em resposta à utilização de cianobactérias fixadoras de nitrogênio. **Acta Sci. Agron**, v. 29, n. 1, 2007, p. 63-68.
- MACHADO, M.O.; MATTOS, M.L.T. Cianobactérias como fonte de nitrogênio orgânico para a cultura do arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2., REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 24., 2001. **Anais...** Porto Alegre: Instituto Rio Grandense do Arroz, 2001. p. 288-289.
- MALONE, G. et al. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, 2006. p. 07-13.
- MAHAFFEE, W. F. et al. Comparative analysis antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining and transgenic marker (bioluminescent) for monitoring the environmental fate of a *Rhizobacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, 1997. p. 1617-1622.
- MANICHANH, C. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v.55, 2006. p.205-211.
- MANO, T.; TANAKA, F.; WATANABE, A.; KAGA, H.; OKUNISHI, S.; MORISAKI, H. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes Environmental**, v. 21, n.2, 2006.
- MARCELINO, P. R. F. **Desenvolvimento de meios de cultivo e formulações inoculantes para Azospirillum brasilense AbV5**. Dissertação de Mestrado. 2012. Universidade Estadual de Londrina, 2011.
- MARGULIS, L.; STOLZ, J. F. Cell symbiosis [correction of symbiosis] theory: status and implications for the fossil record. **Adv Space Res**, 1984.
- MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; MONASTEIRO, O. Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. **Science**, Washington, DC, v.280, n.3, 1998.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, 1995b. p.895-901.
- MORRIS, C. E.; MONIER, J. M.; JACQUES, M. A. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, 1998.

- MULE, M.C.Z. et al. Effects of cyanobacterial inoculation and fertilizers on rice seedling and postharvest soil structure. **Communic. Soil Scienc. Plant Analys.**, Phyladelphia, v. 30, n. 1, 1999. p. 97-107.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, 1998. p.127-141.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E.C. Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59:695-700, 1993.
- NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, M. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-Meio Ambiente, 1998, cap. 1. p. 15-60.
- NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.6-8, 2005.
- NOGALES, B. et al. Combined Use of 16S Ribosomal DNA and 16S rRNA To Study the Bacterial Community of Polychlorinated Biphenyl-Polluted Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001, p. 1874–1884.
- OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and fertility of soil**, New York, v.21, 1996. p. 197-200.
- OLIVEIRA, C. A. et al. **Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, n.11, p.1473-1482, nov. 2009.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia , 2003.
- PAABO, S.; IRWIN, D. M.; WILSON, A. C. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. **J. Biol. Chem.**, v. 265, 1992. p. 4718-4721.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, 1997. p.734-740.
- PALUS, J. A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* lltis and Doebley. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 186, n. 9, 1996. p. 135-142.
- PAN, M. J.; RADEMAN, S.; KUNERT, K.; HASTING, J. W.; Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **JouRNAl of Phytopatoly-Phytopatologishe Zeitschrift**, Berlim, v. 145, 1997. p. 479-486.
- PAVÃO, A. R.; FERREIRA FILHO, J. B. S. **Impactos Econômicos da Introdução do Milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional**. RESR. Vol. 49. Piracicaba-SP, 2011. p. 81-108.

PEDRINHO, E. A. N. et al. **Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de Raízes de milho.** *Bragantia*, Campinas, v. 69, n. 4, 2010. p.905-911.

PEIXOTO NETO de. S. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**, n. 29, 2002.

PEREIRA, M.R. **Diversidade Bacteriana de um Latossolo sob Cultivo Intensivo e Eloresta Através da Análise Metagenômica.** Dissertação de Mestrado. UNESP, Jaboticabal, SP, 2003.

PERIN, L. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, 2006. p. 3103-3110.

PING, L.; BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, 2004. p. 263-269.

PORTAL DO AGRONEGOCIO, 2008. Disponível em:
<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=25562>. Acesso em: Ago. 2009.

PURDY; K. J. *Nucleic acid recovery from complex environmental samples.* **Methods Enzymology**, v. 397, 2005. p. 271-292.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, 1997. p.577-582.

RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crops plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, 2001. p. 1-11.

RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v.57, 2003. p.369-394.

RAVEN, P.H. et al. **Biologia vegetal.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2001.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, 2002. p.2261-2268.

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

REIS, V.M. **Ecofisiologia de bactérias diazotróficas e contribuição da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e palmeiras.** EMBRAPA – AGROBIOLOGIA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em:
<<http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/projetos/012000031.html>> acesso em: 08 Ago. 2009.

- REIS, V. M. **Interações entre plantas e microrganismos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 24 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 194).
- RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomics analysis of microbial communities. **Annual Review of Genetics**, v.38, 2004. p.525-552.
- ROESCH, Luiz FeRNAndo Wurdig. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2007.
- ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archive of microbiology**, New York, v. 181, n. 5, 2004. p. 337-344.
- RONCATO-MACCARI, L. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 45, n. 1, 2003. p. 39-47.
- RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.17, 1999. p.403-409.
- RÖSCH, C; BOTHE, H. 2005. 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, No. 4doi:10.1128/AEM.71.4.2026-2035.2005
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. **Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts**. MPMI v. 19, n. 8, 2006. p. 827–837
- ROSZAK; D. B.; COWELL, R. P. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiol. Rev.**, 1987.
- RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.;SCHMELZER, R. Settlement of diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, The Hague, v. 145, 1992. p. 261-273.
- SANDAA, R.A. et al. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, n. 2, 1998. p. 265-268.
- SAIKI, R. K. et al. primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, 1988.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-25, 1987.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989. Paginação irregular. [S. l.: s.n.].
- SANCHEZ, M. L. P. **Las cianobacterias: cooperacion versus competencia**. Académico numerário, Saragoza, 2011.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, 1977. p. 5463-5467.

SANTOS, M.H.L.C. et al. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v.32, p.1-8, 2005.

SANTOS, O. J. A. P. **Eficiência de metodologias para inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal em milho**. Trabalho de conclusão de curso (dados não publicados). 2011. Universidade Estadual de Londrina, 2011.

SANTOS, T. M. A. **Diversidade genética de bactérias endofíticas associadas a frutos de café (*coffea arabica* L.)**. Tese de Mestrado. 2008. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008.

SCHLOTTER, M. et al. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, 1997. p. 2038-2046.

SCHLOTTER, M. et al. Immunological studies of the what-root-colonization by the Azospirillum brasiliense strain Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: HEGAZI, N. A.; FAYEZ, M.; MONIB, M., (Ed.). **Nitrogen fixation whit non-legumes**; The sixth inteRNAtional symposium on nitrogen fixation whit non-legumes, Ismailia, Egypt. 1994. p. 291-297.

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, 2004. p.1475-1482.

SHARMA, V. K.; NOWAK, J. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. Strains PsJN). **Canadian JouRNAl of Microbiology**, Ottawa, v. 44, 1998. p. 528-536.

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

SHIVA, V. **Monoculturas da Mente: perspectivas da biodiversidade e da biotecnologia**. São Paulo: Gaia, 2003. 240 p.

SICILIANO, S.D. et al. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, 2001. p. 2469–2475.

SILVA, E. C. et al. **Doses e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto sobre Latossolo Vermelho**. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 29, n. 3 Viçosa-ES, 2005. p. 353-362.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. (Ed.), *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*. **ACIAR Proceedings**, 2002. p. 52-66.

SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine Max*) e estudo da interação endófitos-planta.** Tese de Doutorado. 2003. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2003.

STEENHOUDT, O.; VANDELEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 24, n. 4, 2000. p. 487-506.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crop Research**. v. 65, 2000. p. 249-258.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B. R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 72, 2003. p. 107-13.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, 1998. p. 162-167.

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

SUENAGA, H.; OHNUKI, T.; MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. **Environmental Microbiology**, v.9, 2007. p.2289-2297.

SUMNER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Science**, New York, v. 12, n. 1990. p. 53-123.

THOMPSON, J. D., et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 25, n.24, 1997.

TARAZI, M. F. A. **Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na morfologia após antibioticoterapia.** Tese de Doutorado. 2010. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2010.

TITTABUTR, P. et al. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**. v. 33. 2007. p. 69-77.

TEIXEIRA, K. R. dos S. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio.** Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. p.26. (Embrapa-CNPAB, Documento, 32).

THOMPSON, J.D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.24, p.4876-82, 1997.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; LISE, F. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, 1990. p.782-787.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, 2002. p.240-245.

TURCO, R. F. et al. **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p. 73-90.

TYSON, G.W. et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v.428, 2004. p.37-43.

UEDA, T.; SUGA, Y.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in Rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **JouRNAl of Bacteriology**, v.177, 1995. P. 1414-1417.

URETA, A; ALVAREZ, B.RÁMON, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil.**, v. 127, p. 271-+277, 1995.

USDA. Disponível em: <www.usda.gov/oce/waob/wasde/latest.pdf>. Acesso em: 05 de junho. 2005.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Use of genetically improved nitrogen-fixing cyanobacteria in rice paddy fields: Prospects as a source material for engineering herbicide sensitivity and resistance in plants. **Bot. Acta**, Erlangen, v. 111, n. 3, p. 176-190, 1998.

VALDERRAMA, M.; BUZETTI, S.; BENETT, C. G. S.; ANDREOTTI, M.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. **Fontes e doses de npk em milho irrigado sob plantio direto**. Pesq. Agropec. Trop., v. 41, Goiânia-GO, 2011. p. 254-263.

VALE, H.M.M. **Diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cerejeira (*Coffea arabica* L.) e sucessão durante a seca natural**. 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VENTER, J.C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v.304, 2004. p.66-74.

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

VIANEZ JUNIOR, J. L. S. G. **Avaliação criteriosa das seqüências dos genes *rrn*, *rpob* e *gyrb* como ferramentas em taxonomia microbiana**. Tese de Monografia. 2005. Universidade Federal do rio de Janeiro, RJ, 2005.

VIDEIRA, S. S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. Tese de Mestrado. 2008. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Bactérias Diazotróficas em mudas de Bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, 2000. p.2277-2285.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.6578-6583. 1998.

- WIEHE, W.; HECHT-BULCHHOLZ, C.; HOFLICH, G. Electron microscopy investigations on root colonization *Lupinus albus* and *Pisum sativum* with two association plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 17, 1994. p. 15-31.
- WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiology Reviews**, v. 51, n. 2, 1987. p. 221-271.
- WOYKE, T. et al. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. **Nature**, v. 443, 2006. p. 950-955.
- YABUCCHI, E.; KOSAKO, Y. *Sphingomonas*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology: the proteobacteria**. 2 ed., v. 2, New York: Springer, 2005. p. 234-258.
- ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **Eur J Biochem.**, v. 259, n. 3, p. 572-6, 1999.
- ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v. 5, 2003. p. 539-554.
- ZHOU, J. et al. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, 1996. p. 316-22.
- ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiol.** V. 68, 2002. p. 2198-2208.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 9 - Resultado da comparação das sequências parciais da biblioteca de 16S DNAr com o banco de dados do RDP II pelo programa *Classifier*, com índice de confiança variável entre 97 a 100 % e *Sequence Match*.

Tratamento	Clone	Último nível taxonômico	Score	Nome completo
A010	19	Streptophyta	0.737	uncultured bacterium p9m17ok
A010	28	Streptophyta	0.798	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	29	Streptophyta	0.770	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	30	Streptophyta	0.722	uncultured bacterium p9m17ok
A010	39	Streptophyta	0.560	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	45	Streptophyta	0.751	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	46	Streptophyta	0.756	uncultured bacterium p9m17ok
A010	47	Streptophyta	0.731	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	55	Streptophyta	0.962	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	68	Streptophyta	0.895	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	76	Streptophyta	0.864	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	121	Streptophyta	0.891	uncultured bacterium FCPT677
A010	126	Streptophyta	0.863	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	130	Streptophyta	0.921	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	132	Streptophyta	0.935	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	146	Streptophyta	0.283	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	151	Streptophyta	0.926	uncultured bacterium p9m17ok
A010	153	Streptophyta	0.885	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	154	Streptophyta	0.902	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	160	Streptophyta	0.780	uncultured cyanobacterium P-B264
A010	162	Streptophyta	0.903	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	82	Streptophyta	0.834	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	84	Streptophyta	0.834	uncultured bacterium FCPT677
A011	86	Streptophyta	0.860	uncultured bacterium p5o09ok
A011	89	Streptophyta	0.985	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	95	Streptophyta	0.942	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	102	Streptophyta	0.896	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	111	Streptophyta	0.793	uncultured bacterium p9m17ok
A011	117	Streptophyta	0.820	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	174	Streptophyta	0.971	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	177	Streptophyta	0.956	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	179	Streptophyta	0.829	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	183	Streptophyta	0.895	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	188	unclassified_Gammaproteobacteria	0.439	uncultured gamma proteobacterium LSmat.B27
A011	189	Streptophyta	0.972	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	191	Streptophyta	0.878	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	197	Streptophyta	0.959	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	198	Streptophyta	0.980	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	206	Streptophyta	0.947	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	218	Streptophyta	0.825	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	231	Streptophyta	0.960	uncultured bacterium p9m17ok
A011	234	Streptophyta	0.869	uncultured bacterium p5o09ok
A011	237	Streptophyta	0.870	uncultured cyanobacterium P-B264

A011	250	Streptophyta	0.935	uncultured bacterium p9m17ok
A011	253	Streptophyta	0.929	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	259	Streptophyta	0.961	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	263	Novosphingobium	0.359	uncultured bacterium EDW07B003_124
A011	264	Streptophyta	0.889	uncultured bacterium p9m17ok
A011	266	Streptophyta	0.928	uncultured bacterium p9m17ok
A011	270	Streptophyta	0.923	uncultured bacterium p9m17ok
A011	284	Streptophyta	0.942	uncultured bacterium p9f01ok
A011	285	Streptophyta	0.777	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	292	Streptophyta	0.955	uncultured cyanobacterium P-B264
A011	295	Streptophyta	0.993	uncultured bacterium p8k02ok
A011	297	Streptophyta	0.966	uncultured cyanobacterium P-B264
A2I3	300	Streptophyta	0.832	uncultured bacterium FCPT677
A2I3	301	Sphingomonas	0.384	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	302	Sphingomonas	0.399	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	303	Novosphingobium	0.416	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	304	Sandaracinobacter	0.433	uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium GMMC_16S_207
A2I3	305	Novosphingobium	0.410	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	306	Novosphingobium	0.415	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	307	Sphingomonas	0.387	uncultured bacterium E157
A2I3	308	Novosphingobium	0.418	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	309	Novosphingobium	0.425	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	310	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	311	Sphingomonas	0.392	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	312	Sphingomonas	0.371	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	313	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	314	Sandaracinobacter	0.433	uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium GMMC_16S_207
A2I3	315	unclassified_Sphingomonadaceae	0.322	eubacterium sp. 2-13
A2I3	316	Novosphingobium	0.416	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	317	Novosphingobium	0.405	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	318	Sphingomonas	0.402	uncultured bacterium 14_G09
A2I3	319	Sphingomonas	0.394	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	320	Novosphingobium	0.403	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	321	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	322	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	323	Novosphingobium	0.416	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28

A2I3	324	Novosphingobium	0.414	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	325	Novosphingobium	0.431	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	326	unclassified_Sphingomonadaceae	0.377	eubacterium sp. 2-13
A2I3	327	Sphingomonas	0.387	uncultured bacterium 14_G09
A2I3	328	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	329	Novosphingobium	0.384	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	330	Novosphingobium	0.403	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	331	Novosphingobium	0.400	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	332	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	333	Novosphingobium	0.386	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	334	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28;
A2I3	335	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	336	Novosphingobium	0.383	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	337	Novosphingobium	0.438	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	338	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	339	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	340	Novosphingobium	0.406	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	341	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	342	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	343	Sphingomonas	0.396	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	344	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	345	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	346	Novosphingobium	0.419	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	347	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	349	Novosphingobium	0.414	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	350	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	351	Sphingomonas	0.384	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	352	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28

A2I3	353	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	354	Novosphingobium	0.427	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	355	Novosphingobium	0.397	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	356	Novosphingobium	0.411	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	357	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	358	Sphingomonas	0.395	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	359	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	360	Sandaracinobacter	0.432	uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium GMMC_16S_207
A2I3	361	Novosphingobium	0.410	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	362	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	363	Novosphingobium	0.417	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	364	Novosphingobium	0.415	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	365	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	366	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	367	Novosphingobium	0.411	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	368	Novosphingobium	0.389	uncultured eubacterium WD249
A2I3	369	Novosphingobium	0.379	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	370	Novosphingobium	0.395	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	371	Novosphingobium	0.403	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	372	Novosphingobium	0.415	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	373	Sphingomonas	0.415	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	374	Novosphingobium	0.431	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	375	Sandaracinobacter	0.432	uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium GMMC_16S_207
A2I3	376	Novosphingobium	0.425	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	377	Novosphingobium	0.412	uncultured bacterium Foos8B_63
A0I3	378	Novosphingobium	0.448	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	379	Novosphingobium	0.444	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	380	Sphingomonas	0.392	uncultured bacterium 5C230993
A0I3	381	Novosphingobium	0.419	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28

A013	382	Sphingomonas	0.410	uncultured bacterium 14_G09
A013	383	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	384	Novosphingobium	0.459	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	385	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	386	Novosphingobium	0.461	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	387	Novosphingobium	0.414	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	388	Sphingomonas	0.400	uncultured bacterium 14_G09
A013	389	Novosphingobium	0.401	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	390	Novosphingobium	0.388	bacterium 070401
A013	391	Novosphingobium	0.402	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	392	Novosphingobium	0.385	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	393	Novosphingobium	0.386	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	394	Sphingomonas	0.393	Sphingomonas sp. SKJH-30
A013	395	Novosphingobium	0.420	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	396	Sphingomonas	0.387	uncultured bacterium 5C230993
A013	397	Sphingomonas	0.405	uncultured bacterium 14_G09
A013	398	Novosphingobium	0.411	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	399	Novosphingobium	0.444	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	400	Novosphingobium	0.411	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	401	Novosphingobium	0.453	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	402	Limnohabitans	0.664	uncultured bacterium SBfYyy37
A013	403	Novosphingobium	0.427	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	404	Novosphingobium	0.409	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A013	405	unclassified_Sphingomonadaceae	0.399	uncultured bacterium TX2_4H20
A013	615	Streptophyta	1.000	uncultured bacterium; FFCH5762
A013	617	Streptophyta	0.931	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	625	Streptophyta	0.765	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	623	Streptophyta	1.000	uncultured Xanthomonadales bacterium
A013	622	Streptophyta	0.767	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	621	Streptophyta	0.983	uncultured bacterium; FFCH5762
A013	626	Streptophyta	0.766	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	635	Streptophyta	0.756	uncultured bacterium; nbt39h09
A013	627	Streptophyta	0.800	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	630	Streptophyta	0.896	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	631	Streptophyta	0.772	uncultured bacterium; p5o09ok

A013	632	Streptophyta	0.771	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	633	Streptophyta	0.774	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	636	Streptophyta	1.000	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	642	Streptophyta	1.000	uncultured bacterium; nbt39h09
A013	639	Streptophyta	0.802	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	637	Sphingomonas	0.384	Sphingomonas sp. D12
A013	640	Streptophyta	0.801	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	648	Streptophyta	0.986	uncultured bacterium; nbt39d05
A013	645	Streptophyta	0.774	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	643	Streptophyta	0.874	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	649	Streptophyta	0.801	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	654	Streptophyta	0.805	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	650	Streptophyta	0.760	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	652	Streptophyta	0.805	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	653	Streptophyta	0.803	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	662	Streptophyta	0.798	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	660	Streptophyta	0.931	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	664	Streptophyta	0.799	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	657	Streptophyta	0.769	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	670	Streptophyta	0.772	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	669	Streptophyta	0.765	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	665	Streptophyta	0.866	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	668	Streptophyta	0.806	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	672	Streptophyta	0.902	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	673	Streptophyta	0.924	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	671	Streptophyta	0.888	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	676	Streptophyta	0.991	uncultured bacterium; FFCH5762
A013	677	Streptophyta	0.905	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	675	Streptophyta	0.754	uncultured bacterium; p5o09ok
A013	683	Streptophyta	0.986	uncultured bacterium; FFCH5762
A013	681	Streptophyta	0.770	uncultured bacterium; p5o09ok
A210	474	Streptophyta	0.727	uncultured bacterium; nbt39h09
A210	476	Streptophyta	0.663	uncultured cyanobacterium; P-B264
A210	475	Streptophyta	0.729	uncultured bacterium; p9m17ok
A210	477	Streptophyta	0.689	uncultured bacterium; p9m17ok
A210	485	Streptophyta	0.801	uncultured bacterium; p9m17ok
A210	481	Streptophyta	0.898	uncultured cyanobacterium; P-B264
A210	480	Streptophyta	0.667	uncultured bacterium; p9m17ok
A210	489	Streptophyta	0.715	uncultured cyanobacterium; P-B264
A210	490	Streptophyta	0.807	uncultured cyanobacterium; P-B264
A210	497	Streptophyta	0.733	uncultured bacterium; nbt39h09
A210	509	Streptophyta	0.795	uncultured bacterium; p9m17ok
A210	506	Streptophyta	0.975	uncultured bacterium; p9m17ok
A210	507	Streptophyta	0.796	uncultured bacterium; nbt35a03
A210	505	Streptophyta	0.732	uncultured bacterium; nbt39h09
A210	521	Streptophyta	0.734	uncultured bacterium; nbt39h09
A210	532	Streptophyta	0.780	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	410	Streptophyta	0.700	uncultured bacterium; nbt39h09
A211	408	Streptophyta	0.728	uncultured bacterium; p9m17ok
A211	409	Streptophyta	0.748	uncultured bacterium; nbt39h09
A211	417	Streptophyta	0.742	uncultured bacterium; nbt39h09
A211	418	Streptophyta	0.846	uncultured cyanobacterium; P-B264

A2I1	422	Streptophyta	0.742	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	425	Streptophyta	0.718	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	423	Streptophyta	0.711	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	428	Streptophyta	0.595	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	436	Streptophyta	0.740	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	433	Streptophyta	0.615	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	432	Streptophyta	0.730	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	434	Streptophyta	0.734	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	437	Streptophyta	0.738	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	443	Streptophyta	0.733	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	442	Streptophyta	0.712	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	441	Streptophyta	0.739	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	439	Streptophyta	0.736	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	446	Streptophyta	0.733	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	447	Streptophyta	0.702	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	452	Streptophyta	0.725	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	445	Streptophyta	0.734	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	454	Streptophyta	0.714	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	463	Streptophyta	0.710	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	471	Streptophyta	0.667	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	548	Streptophyta	1.000	uncultured Xanthomonadales bacterium
A2I1	546	Streptophyta	0.776	uncultured cyanobacterium; P-B264
A2I1	553	Streptophyta	0.846	uncultured cyanobacterium; P-B264
A2I1	562	Streptophyta	0.801	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	554	Streptophyta	0.777	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	557	Streptophyta	0.781	uncultured bacterium; p9m17ok
A2I1	558	Streptophyta	0.760	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	559	Streptophyta	0.808	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	560	Streptophyta	0.752	uncultured bacterium; nbt39h09
A2I1	569	Streptophyta	0.865	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	565	Streptophyta	0.802	uncultured cyanobacterium; P-B264
A2I1	566	Streptophyta	0.748	uncultured bacterium; nbt39h09
A2I1	568	Streptophyta	0.780	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	567	Streptophyta	0.807	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	573	Streptophyta	0.875	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	570	Streptophyta	0.873	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	572	Streptophyta	0.864	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	575	Streptophyta	0.837	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	576	Streptophyta	0.797	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	583	Streptophyta	0.815	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	582	Streptophyta	0.753	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	581	Streptophyta	0.793	uncultured cyanobacterium; P-B264
A2I1	577	Streptophyta	0.770	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	584	Streptophyta	0.800	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	586	Streptophyta	0.814	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	585	Streptophyta	0.748	uncultured bacterium; nbt39h09
A2I1	597	Streptophyta	0.796	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	596	Streptophyta	0.915	uncultured cyanobacterium; P-B264
A2I1	593	Streptophyta	0.769	uncultured bacterium; p5o09ok
A2I1	594	Streptophyta	0.774	uncultured bacterium; p5o09ok

A211	595	Streptophyta	0.862	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	600	Streptophyta	0.904	uncultured cyanobacterium; P-B264
A211	607	Streptophyta	0.971	uncultured cyanobacterium; P-B264
A211	601	Streptophyta	0.865	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	599	Streptophyta	0.817	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	604	Streptophyta	0.856	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	605	Streptophyta	0.970	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	602	Streptophyta	0.794	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	606	Streptophyta	1.000	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	603	Streptophyta	0.828	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	612	Streptophyta	0.898	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	611	Streptophyta	0.801	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	610	Streptophyta	0.901	uncultured bacterium; p5o09ok
A211	609	Streptophyta	0.766	uncultured bacterium; p5o09ok

Tabela 10 - Resultado da comparação das sequências parciais da biblioteca de 16S DNAr da biblioteca de DNAc com o banco de dados do RDP II pelo programa *Classifier*, com índice de confiança variável entre 97 a 100 % e *Sequence Match*.

Tratamento	Clone	Último nível taxonômico	Score	Nome completo
A0I3	3	Blastomonas	0.340	uncultured bacterium ER14
A0I3	4	Sphingomonas	0.402	uncultured bacterium 126
A0I3	5	Sphingomonas	0.408	uncultured bacterium 5C230993
A0I3	6	Novosphingobium	0.387	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	7	Novosphingobium	0.372	uncultured bacterium EDW07B003_79
A0I3	8	Novosphingobium	0.381	uncultured bacterium 577_A02_PCE_column_outflow
A0I3	9	Novosphingobium	0.430	uncultured eubacterium WD249
A0I3	10	Gemmatimonas	0.290	uncultured bacterium 1-6B
A0I3	11	Sphingomonas	0.424	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	13	Sphingomonas	0.406	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	15	Sphingomonas	0.376	uncultured bacterium 5C230993
A0I3	16	Novosphingobium	0.378	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	17	Sphingomonas	0.372	uncultured bacterium EDW07B005_91
A0I3	18	Sphingomonas	0.398	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	19	Novosphingobium	0.397	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	20	Novosphingobium	0.364	uncultured bacterium FB03H05
A0I3	21	Sphingomonas	0.387	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	22	Sphingomonas	0.370	uncultured bacterium 5C230993
A0I3	23	Novosphingobium	0.415	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	25	Novosphingobium	0.413	uncultured eubacterium WD249
A0I3	26	Sphingomonas	0.462	uncultured Sphingomonas sp. 32
A0I3	27	Novosphingobium	0.379	uncultured alpha proteobacterium MVS-99
A0I3	28	Sphingomonas	0.318	Sphingomonas sp. DR1
A0I3	29	Novosphingobium	0.359	uncultured bacterium FB03H05

A0I3	30	Sphingomonas	0.458	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	31	Novosphingobium	0.415	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	32	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	33	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	34	Novosphingobium	0.386	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	35	Novosphingobium	0.405	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	36	Novosphingobium	0.452	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	37	Novosphingobium	0.459	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	38	Sandaracinobacter	0.385	uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium GMMC_16S_207
A0I3	39	Novosphingobium	0.448	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	40	Novosphingobium	0.388	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	41	Sphingomonas	0.407	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	42	Sphingomonas	0.411	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	43	Sphingomonas	0.385	Sphingomonas sp. D12
A0I3	44	Novosphingobium	0.417	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	45	Novosphingobium	0.388	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A0I3	46	Sphingomonas	0.398	uncultured bacterium 14_G09
A0I3	49	Streptophyta	1.000	uncultured bacterium; FFCH5762
A0I3	48	Novosphingobium	0.426	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	1	Novosphingobium	0.440	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	2	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	50	Novosphingobium	0.412	uncultured eubacterium WD249
A2I3	51	Novosphingobium	0.394	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	52	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	53	Novosphingobium	0.415	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	54	Novosphingobium	0.401	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	55	Novosphingobium	0.417	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	56	Novosphingobium	0.416	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	57	Novosphingobium	0.413	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	58	Novosphingobium	0.388	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	59	Novosphingobium	0.441	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28

A2I3	60	Sphingomonas	0.394	uncultured bacterium 14_G09
A2I3	61	Novosphingobium	0.414	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	62	Novosphingobium	0.419	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	63	Novosphingobium	0.418	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	64	Sphingomonas	0.401	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	65	Novosphingobium	0.410	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	66	Novosphingobium	0.418	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	67	Novosphingobium	0.386	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	68	Novosphingobium	0.420	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	69	Novosphingobium	0.416	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	70	unclassified_"Proteobacteria"	0.448	uncultured bacterium BN61
A2I3	71	Novosphingobium	0.419	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	72	Novosphingobium	0.387	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	73	Novosphingobium	0.432	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	74	Novosphingobium	0.417	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	75	Novosphingobium	0.388	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	76	Novosphingobium	0.427	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	77	Novosphingobium	0.387	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	78	Sphingomonas	0.416	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	79	Novosphingobium	0.458	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	80	Sphingomonas	0.391	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	81	Sphingomonas	0.442	uncultured bacterium 5C230993
A2I3	82	Novosphingobium	0.360	uncultured bacterium ncd982f10c1
A2I3	83	Sandaracinobacter	0.432	uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium GMMC_16S_207
A2I3	84	Novosphingobium	0.417	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	85	Novosphingobium	0.412	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	86	Novosphingobium	0.411	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
A2I3	87	Novosphingobium	0.416	uncultured alpha proteobacterium ADK-RQh02-28
