



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUAN DA LUZ RAMOS

**SELEÇÃO DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE *Azomonas* sp.
COM MAIOR CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS INDÓLICOS E EXCREÇÃO DE AMÔNIO**

Londrina
2016

LUAN DA LUZ RAMOS

**SELEÇÃO DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE *Azomonas* sp.
COM MAIOR CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS INDÓLICOS E EXCREÇÃO DE AMÔNIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luíz Martinez Oliveira.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ramos, Luan da Luz.

SELEÇÃO DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE *Azomonas* sp. COM MAIOR CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS E EXCREÇÃO DE AMÔNIO / Luan da Luz Ramos. - Londrina, 2016.
82 f. : il.

Orientador: André Luíz Martinez Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal - Teses. 2. Metabolismo de nitrogênio - Teses. 3. Microbiologia agrícola - Teses. I. Martinez Oliveira, André Luíz. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

LUAN DA LUZ RAMOS

**SELEÇÃO DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE *Azomonas* sp. COM
MAIOR CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS
E EXCREÇÃO DE AMÔNIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de março de 2016.

Dedico este trabalho à minha mãe Juceli Moraes da Luz, pela educação, carinho e amor incondicional, além de todo o incentivo que me auxiliou a chegar até aqui.

À minha irmã Taynara da Luz Ramos, pelo carinho e pelo apoio prestado em todas as minhas escolhas.

Aos meus avôs e demais familiares que sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina pela estrutura disponibilizada para a realização do curso de mestrado.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia pela oportunidade oferecida.

Ao CNPq, Fundação Araucária, INCT-FBN pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, que contribuíram grandemente no aprimoramento de meus conhecimentos.

Ao meu orientador, professor André Luiz Martinez de Oliveira, pela orientação constante no desenvolvimento desse trabalho. Também lhe agradeço por sua amizade e dedicação, assim como pela paciência durante todo o período de execução do mestrado.

A professora Elisete pelo empenho e apoio durante a realização da pesquisa.

Aos técnicos de laboratório Nelson, Sílvia e Ideval por toda a assistência prestada.

Aos colegas que fiz durante o curso de mestrado, pois estivemos juntos em vários momentos durante essa etapa de nossas vidas. Em especial quero agradecer a Mayara Barbosa, Karina Milani, Monica Yorlady e Odair Pais pelo apoio.

A minha mãe e minha irmã, que mesmo estando longe nunca mediram esforços para me apoiar e me incentivar a alcançar meus objetivos.

A Deus, por sempre estar me dando forças e proteção.

Enfim, dedico este trabalho a todos que de uma forma ou de outra passaram por minha vida e me influenciaram positivamente a chegar até aqui. Que Deus abençoe a todos e continue iluminando a vida e o caminho de cada um de nós.

*Um pouco de ciência nos afasta de
Deus. Muito, nos aproxima.
(Louis Pasteur)*

RAMOS, Luan da Luz. **Seleção de mutantes aleatórios de *Azomonas* sp. com maior capacidade de produção de compostos indólicos e excreção de amônio.** 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Diversas pesquisas têm mostrado que bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) são capazes de substituir total ou parcialmente insumos agrícolas industriais, atuando na disponibilização e no aumento da eficiência de uso de nutrientes disponíveis no solo. Dentre os diferentes mecanismos de promoção do crescimento exibidos por BPCV, a atividade diazotrófica possui enorme importância agrônômica, devido à escassez de nitrogênio em solos agrícolas, o elevado custo de aquisição e aplicação de fertilizantes nitrogenados, e o potencial de contaminação do ambiente pelo uso indiscriminado destes insumos. No Brasil, algumas estirpes de microrganismos diazotróficos promotores de crescimento estão registradas para uso comercial em culturas de trigo, arroz, milho, e diversas espécies leguminosas. Com isso, são também necessárias ações para o melhoramento destes microrganismos buscando incrementar os mecanismos ativos na promoção do crescimento vegetal, e desta forma proporcionar o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos. Diante deste quadro foram aplicados processos mutagênicos aleatórios, químicos e físicos, sobre uma BPCV isolada de raízes de milho e identificada como *Azomonas* sp. estirpe 4.3.1.1, seguindo a seleção dos mutantes obtidos para identificar variantes com capacidade aumentada de excreção de amônio. Esse trabalho resultou na identificação de 16 estirpes mutantes de *Azomonas* sp. com alteração no metabolismo do nitrogênio, reveladas pela capacidade de crescimento em meio de cultivo adicionado com 30 mM de etilenodiamina, um composto inibidor da enzima glutamina sintetase responsável pela assimilação de amônio. Dentre estes mutantes destacou-se a estirpe *Azomonas* sp. B1T7-6, que apresentou níveis de excreção de amônio e produção de compostos indólicos superiores à estirpe selvagem. Em adição, o desenvolvimento inicial de plantas de milho na presença da estirpe B1T7-6 resultou em incrementos na quantidade de matéria seca e no comprimento de raízes, quando comparadas às plantas inoculadas com a estirpe selvagem. Os índices de excreção de amônio e produção de compostos indólicos pela estirpe B1T7-6 foram 86% e 100% superiores à estirpe selvagem, respectivamente, enquanto o acúmulo de matéria seca em plantas de milho foi 12% superior à mesma. Estes resultados demonstraram que a eficiência dos processos biológicos utilizados na agricultura pode ser aumentada, e expandida para espécies bacterianas pouco utilizadas como insumo biotecnológico. Futuros estudos serão necessários para melhor compreensão das alterações metabólicas e genéticas que possam ter influenciado o desempenho da estirpe mutante.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Etilenodiamina. Metabolismo do nitrogênio. Biotecnologia agrícola.

RAMOS, Luan da Luz. **Selection of random mutants *Azomonas* sp. with greater capacity of indole compounds and ammonium excretion.** 2016. 82 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) - State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Several studies have shown that plant growth promoting bacteria (PGPB) is able to fully or partially replace the industrial inputs in agriculture, increasing the availability and efficiency of nutrients use in the soil. Among the different growth-promoting mechanisms exhibited by PGPB, the diazotrophic activity has huge agronomic importance, due to the deficiency of nitrogen in most agricultural soils, the high cost of acquisition and application of nitrogen fertilizer, and the potential for environmental hazard by the indiscriminate use of N-fertilizer inputs. In Brazil, some strains of growth-promoting diazotrophic bacteria are registered for commercial use in wheat, rice, corn, and several legume species. Meanwhile, breeding actions are necessary to improve these non-symbiotic associations aiming to increase the mechanisms active in plant growth promotion, which can then lead to the development of new biotechnological products. As result of this situation, random chemical and physical mutagenic processes were applied to the *Azomonas* sp. 4.3.1.1, a PGPB isolated from maize roots, followed by the screening and selection of mutants that showed enhanced ammonium excretion. This work resulted in the identification of 16 mutants strains of *Azomonas* sp. altered in the nitrogen metabolism, revealed by its growth ability in culture medium added with 30 mM ethylenediamine, an inhibitor of the enzyme glutamine synthetase which is involved in ammonium assimilation. Among these mutants, the strain *Azomonas* sp. B1T7-6 was featured and showed ammonium excretion levels and indoles production higher than the wild type. The ammonium excretion rates and production of indoles by B1T7-6 strain were 86% and 100% higher than the wild type. In addition, the early development of maize plants in the presence of B1T7-6 strain resulted in higher amounts of dry matter and higher root length when compared to plants inoculated with the wild type strain. These results supports previous findings which indicates that the efficiency of the biological processes used in agriculture can be increased and expanded by the biotechnological exploitation of uncommon associative strains and its use in breeding programs. Future studies will be need to better understand the metabolic and genetic changes that may have influenced the performance of mutant strain.

Keywords: Plant growth promoting bacteria. Ethylenediamine. Nitrogen metabolism. Agricultural biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Ciclo do nitrogênio	27
Figura 2 –Ciclo GS/GOGAT	29
Figura 3 –Taxa de sobrevivência da estirpe 4.3.1.1 de <i>Azomonas sp.</i> após mutação química	44
Figura 4 –Taxa de sobrevivência da estirpe 4.3.1.1 de <i>Azomonas sp.</i> após mutação física	44
Figura 5 –Taxa de tolerância da estirpe 4.3.1.1 de <i>Azomonas sp.</i> após crescimento em meio de cultura L sólido com diferentes concentrações de Etilenodiamina.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Relação entre excreção de NH_4^+ e proteínas celulares	47
Tabela 2 –Relação entre produção de auxinas e proteínas celulares	49
Tabela 3 –Sementes germinadas de acordo com estirpe inoculada	51
Tabela 4 –Peso médio de matéria fresca de parte aérea e raiz	52
Tabela 5 –Peso médio de matéria seca de parte aérea e raiz	54
Tabela 6 –Diâmetro de raiz, Área superficial de raiz (cm^2), Volume de raiz (cm^3) e comprimento de raiz (cm)	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido-3-indol-acético
BPCV	Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
EDA	Etilenodiamina
EMS	Etilmetano sulfonato
GS	Glutamina-sintetase
M	Molar
mM	Milimolar
MMS	Metil-metano-sulfonato
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	JUSTIFICATIVA	15
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	16
4.2	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	20
4.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	21
4.4	ASSIMILAÇÃO DE N EM BACTÉRIAS	25
4.5	GLUTAMINA-SINTETASE	26
4.6	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM ASSOCIAÇÃO A GRAMÍNEAS	28
4.7	PRODUÇÃO DE AUXINAS	29
4.8	MUTAGÊNESE INDUZIDA	30
4.9	AGENTES MUTAGÊNICOS FÍSICOS	32
4.10	AGENTES MUTAGÊNICOS QUÍMICOS	33
4.11	MUTANTES EXCRETORES DE AMÔNIO	34
5	METODOLOGIA	36
5.1	ESTIRPE UTILIZADA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	36
5.2	INDUÇÃO DE MUTAGÊNESE ALEATÓRIA	36
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE AMÔNIO	38
5.4	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS (ÁCIDO INDOLACÉTICO)	39
5.5	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	39
5.6	INCREMENTO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE MILHO	40

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1	MUTAGÊNESE	42
6.2	EXCREÇÃO DE AMÔNIO PELAS ESTIRPES SELECIONADAS	45
6.3	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS PELAS ESTIRPES SELECIONADAS	46
6.4	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS	49
6.4.1	Peso de Matéria Fresca	50
6.4.2	Peso de Matéria Seca	52
6.4.3	Arquitetura do Sistema Radicular	53
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	77
	ANEXO A –Meio JMV	78
	ANEXO B –Tampão fosfato	79
	ANEXO C –Meio L	80
	ANEXO D –Meio Dygs	81
	ANEXO E –Imagem digitalizada de raiz para análise por software gearoots	82

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola é afetada diretamente pela utilização de fertilizantes químicos, dos quais é dependente para que possa ser alcançada uma alta produtividade. Porém, o uso indiscriminado de fertilizantes químicos podem trazer problemas graves para a sustentabilidade do meio ambiente, como a contaminação da água.

A utilização de bactérias com capacidade de promoção de crescimento vegetal, responsáveis pelo fornecimento de nutrientes às plantas por meio de processos bioquímicos é uma estratégia bastante estudada na atualidade para a diminuição do uso de fertilizantes químicos. Um exemplo de bactérias utilizadas são os inoculantes agrícolas preparados e comercializados com o intuito de promover a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

O presente trabalho teve por objetivo incrementar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio da bactéria promotora do crescimento vegetal *Azomonas* sp., aplicando metodologias de indução de mutação aleatória. Essa bactéria foi isolada inicialmente da rizosfera de plantas de milho e demonstrou alta capacidade de promoção de crescimento vegetal em testes iniciais de germinação e desenvolvimento.

A utilização de métodos aleatórios de mutagênese torna mais fácil a disposição para uso de uma estirpe alterada, uma vez que não conduz à obtenção de organismo transgênico. A busca por alternativas sustentáveis, que possam trazer benefícios econômicos e ambientais para os sistemas agrícolas é o que motiva as pesquisas relacionadas à interação planta-bactéria, procurando alternativas biotecnológicas para a resolução de problemas e aumento da produção agrícola.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter mutantes da estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas* sp, uma bactéria isolada de milho, pela técnica de mutagênese aleatória, com o intuito de obter uma estirpe com maior capacidade de atividade diazotrófica, incrementando o fornecimento e absorção de nutrientes em gramíneas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter mutantes da estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas* sp. com o uso de radiação ultravioleta e do agente mutagênico metil-metano-sulfonato (MMS).
2. Selecionar mutantes com capacidade alterada de excreção de amônio (NH_4^+).
3. Avaliar a capacidade de excreção de amônio e produção de compostos indólicos pelos mutantes selecionados.
4. Avaliar o potencial de promoção do crescimento de milho pelos mutantes e a estirpe selvagem.

3 JUSTIFICATIVA

A atividade agrícola pode ser grandemente beneficiada pela utilização da diversidade microbiana em novos processos biotecnológicos. A diminuição do uso de fertilizantes minerais, associada a uma maior eficiência na absorção dos nutrientes pelas plantas cultivadas, são metas possíveis de serem atingidas pela exploração e utilização de microrganismos eficientes na promoção do desenvolvimento de plantas. Aliado a isso, o cenário atual é de aumento contínuo do consumo de fertilizantes. Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), o consumo de fertilizantes no Brasil vem apresentando aumento crescente, enquanto a produção de fertilizantes no Brasil está praticamente estagnada desde 2010. Em conjunto, estes dados indicam uma grande dependência da atividade agrícola brasileira por insumos estrangeiros, o que pode causar insegurança econômica e levar ao aumento dos custos de produção. Uma das alternativas concretas para diminuir a dependência da agricultura brasileira por fertilizantes é a ampliação da oferta de insumos biológicos de alta eficiência, que possam atuar na disponibilização de nutrientes requeridos em grandes quantidades pelos cultivos agrícolas, como o nitrogênio. A possibilidade de obtenção de microrganismos com capacidade aumentada para a atividade diazotrófica, aplicando uma metodologia de indução de mutagênese aleatória, é uma estratégia viável neste sentido. Em adição, os mutantes obtidos por processos que não incluam a tecnologia do DNA recombinante não são considerados geneticamente modificados, portanto seu registro como produto biotecnológico é facilitado.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Os microrganismos são fundamentais para a manutenção da vida no planeta, porém ainda se entende muito pouco sobre a maioria dos microrganismos que habitam os oceanos, atmosfera, o próprio corpo humano e o solo. Técnicas de cultura microbiana tem permitido isolar cada vez mais microrganismos com o intuito de estudá-los com detalhes, e técnicas moleculares tem permitido a identificação dos mesmos. Diversas comunidades microbianas de diversos ambientes vêm sendo estudadas dessa forma, para que sejam compreendidas suas funções ecológicas (GILBERT et al., 2010).

No passado os anatomistas e fisiologistas vegetais consideravam as plantas como organismos únicos e desconsideravam a existência de associações microbianas. Porém o avanço da ciência tem demonstrado que as plantas abrigam microecossistemas complexos, que são explorados por uma enorme diversidade de bactérias benéficas, como associativas e simbióticas, e por bactérias maléficas, como fitopatogênicas (HALLMANN et al., 1997; COMPANT et al., 2011).

O microbioma vegetal é determinante na saúde e produtividade das plantas e é alvo de inúmeros estudos por sua importância ambiental e agrícola (BULGARELLI et al., 2013). Esses microrganismos podem ser encontrados em diversas regiões das plantas, como folhas, sementes, flores, caules e raízes (LEME et al., 2013). Na rizosfera ocorrem inúmeras relações bióticas, entre elas a ação de microrganismos decompositores, predadores, patógenos e simbiontes (EISENHAUR, 2012).

Amplios estudos sobre o sistema imune vegetal têm sido feitos com a intenção de compreender os processos celulares responsáveis pela percepção de patógenos e vias de sinalização que levam a resistência por parte da planta. As plantas, diferentemente dos animais, não possuem um sistema imune adaptativo composto por células móveis, o que causa a necessidade de que cada célula tenha a capacidade de percepção do patógeno e sinalize as células vizinhas para a produção de uma defesa (FU; DONG, 2013).

A maioria dos microrganismos possuem estruturas conservadas denominadas MAMPs (microorganism associated molecular patterns) ou PAMPs (pathogen-

associated molecular patterns), que podem ser peptideoglicanos, flagelina, lipopolissacarídeos ou fragmentos de quitina. Os tecidos vegetais possuem receptores de membranas extracelulares, denominados PRR (pattern recognition receptors), que são os primeiros responsáveis por perceber microrganismos patogênicos e que reconhecem essas estruturas conservadas (DAVIDSSON et al., 2013).

As defesas ativadas pelos MAMPs são chamadas de MTI (MAMP-triggered immunity). Essas defesas, além de serem de baixa intensidade, são restritas à região de contato, não havendo ativação de nenhuma defesa em tecidos distantes do local de infecção (LIU et al., 2013). Em uma interação compatível, o patógeno tem capacidade de reprimir os mecanismos de defesa da planta hospedeira, se desenvolvendo nos tecidos vegetais e manifestando os sintomas da doença por meio de mecanismos de patogenicidade, como secreção de enzimas líticas extracelulares e produção de toxinas (GACHOMO et al., 2003; SPOEL; DONG, 2012). Na interação incompatível, o agressor é reconhecido pela planta e é bloqueado no sítio de infecção. Esse tipo de incompatibilidade ocorre quando a planta possui um receptor celular, uma proteína R que é codificada pelo gene de resistência, com capacidade de interação específica com a proteína elicitora levando a ativação acelerada das vias de transdução de sinais que resultam na resposta de resistência. Essa resposta é caracterizada muitas vezes pela reação de hipersensibilidade, que é a morte celular programada de células vegetais contaminadas com o patógeno e células adjacentes ao sítio infeccioso, causando bloqueio e eliminação do agente invasor (STASKAWICZ et al., 2001; HEIDRICH et al., 2012; SPOEL; DONG, 2012)

A importância econômica e ambiental relacionada às doenças causadas por bactérias na agricultura traz a necessidade de pesquisas na busca pelo controle alternativo, reduzindo o uso de defensivos agrícolas com alta taxa de toxicidade, com o intuito de conciliar a preservação ambiental e a produção de alimentos (FAROOQ et al., 2011).

Entre as relações ecológicas merecem destaque também as que causam efeitos benéficos para as plantas, atuando de forma direta ou indireta sobre o balanço hormonal, proteção contra organismos nocivos e nutrição vegetal (ZABIHI et al., 2011). Existe no solo um número incalculável de bactérias com capacidade de viver livremente ou em associação com plantas. Estas bactérias são responsáveis

por uma série de intervenções que garantem a qualidade do solo e são fundamentais para a sustentabilidade agrícola. Essas interações proporcionam como resultado a sanidade das plantas e a fertilidade do solo, assim como a biodegradação de contaminantes (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007; STEFANIS et al., 2013).

A diversidade bacteriana do solo não está distribuída de maneira homogênea, e possui composição variável conforme a profundidade, teor de matéria orgânica, e cobertura vegetal, por exemplo (LAKSHMANAN et al., 2014). A rizosfera é definida como a região que sofre influência direta das raízes, possibilitando uma grande proliferação microbiana, e onde é encontrado o maior número de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), influenciada pela maior quantidade de nutrientes, que são provenientes dos exsudatos radiculares. Esses exsudatos causam incrementos nas atividades biológicas e químicas, tornando a rizosfera a região do solo com maior colonização por microrganismos (PRASHAR et al., 2014).

As bactérias que colonizam e habitam a região da rizosfera são denominadas rizobactérias. Os efeitos benéficos dessas bactérias sobre as plantas podem compreender a influência na disponibilização de minerais como fosfato, a produção de antibióticos que controlam fitopatógenos, a produção de sideróforos, a promoção de crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios e a fixação biológica de nitrogênio (KUMAR et al., 2012).

Inúmeros carboidratos, ácidos orgânicos e outros compostos fornecem nutrientes para bactérias associativas. Esses compostos são liberados em forma de exsudatos na rizosfera, atraindo quimicamente as bactérias, que por sua vez se movimentam em direção aos exsudatos colonizando e multiplicando-se na rizosfera e rizoplano (COMPANT et al., 2010).

A estrutura da comunidade bacteriana presente na rizosfera varia de acordo com a idade da planta, concentração e composição de exsudatos, compostos por: ácidos orgânicos; vitaminas; fitormônios; aminoácidos; polissacarídeos; íons; enzimas; vitaminas; proteínas e metabólitos secundários. Esses compostos são utilizados como fonte de carbono pelos microrganismos, fornecendo energia para o crescimento e reprodução dos mesmos (PRASHAR et al., 2014). A concentração e composição dos exsudatos, por sua vez, são afetadas por fatores ambientais, como quantidade de oxigênio presente, temperatura, disponibilidade de nutrientes,

profundidade do solo, pH, microrganismos presentes, entre outros (MIMMO et al., 2011).

Os gêneros microbianos mais comuns presentes na rizosfera de plantas são: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Rhizobia*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacter*, *Cellulomonas* e *Bacillus* (SAHARAN; NEHRA, 2011).

Entre as estirpes isoladas de determinada região, nem todas apresentam elevadas taxas de promoção de crescimento vegetal, trazendo a necessidade de escolha de estirpes com potencial para utilização na agricultura. Essas estirpes devem ser avaliadas *in vitro* sobre suas propriedades fisiológicas e bioquímicas, para assim serem selecionadas para ensaios em casa de vegetação e validação das propriedades promotoras de crescimento em condições de campo (RODRIGUES et al., 2007; COUILLEROT et al., 2013).

Estudos sobre interação planta-bactéria em gramíneas, especialmente em cereais, demonstraram avanços positivos em aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos e ecológicos (BALDANI; BALDANI, 2005). O desenvolvimento de inoculantes com estirpes de alta eficiência para uso em cereais é dependente da avaliação e seleção de microrganismos para culturas específicas (HUNGRIA, 2011).

Segundo Summer (1990) a inoculação de bactérias isoladas da mesma variedade de plantas se torna mais eficaz, principalmente quando a população nativa se faz presente. Isso se explica pelo fato de que organismos adaptados às condições ambientais da região tem capacidade de apresentar melhores condições de concorrência com a biota nativa, tanto pela adaptação as condições ambientais, quanto pelo aumento populacional causado pela inoculação.

Inoculantes comerciais já foram formulados no Brasil com cepas de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, onde foi comprovado aumento no desenvolvimento de milho e trigo em 27% e 31%, respectivamente. A promoção de desenvolvimento radicular e resistência a estresses bióticos e abióticos resultantes das interações associativas também mostraram aumento na eficiência e absorção de nutrientes (HUNGRIA et al., 2010).

A grande dependência da agricultura em relação a insumos químicos, como fertilizantes nitrogenados, e a influência negativa do uso desordenado desses insumos sobre a qualidade do ambiente de produção, apontam para uma alta

potencialidade do uso da biotecnologia nos sistemas agrícolas. A utilização de organismos diazotróficos e a exploração de seu potencial, relacionado à nutrição nitrogenada das culturas e a outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal resultam em efeitos diretos tanto na economia quanto na sustentabilidade do meio ambiente.

4.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Diversos grupos taxonômicos de bactérias são considerados promotores de crescimento vegetal (BPCV), por serem capazes de estabelecer relações benéficas com diferentes plantas, incluindo gramíneas como cana de açúcar, e cereais como arroz, trigo, e milho. Quando colonizam os tecidos internos podem ser denominadas como endofíticas (HAYAT, 2010). A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é uma das características mais importantes das bactérias promotoras de crescimento vegetal, que faz com que seja diminuída a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados, diminuindo a poluição ambiental causada por esses insumos e diminuindo os custos de produção (GOPALAKRISHNAN, 2014). Em ecossistemas naturais ou de manejo, a associação de bactérias benéficas a raízes de plantas possui um papel fundamental na sanidade e no estímulo ao desenvolvimento das mesmas (COMPANT et al., 2012).

A biotecnologia representa um importante papel na produção agrícola e cada vez mais a manipulação das condições de campo e de populações benéficas permite vislumbrar um modelo de agricultura sustentável (OLIVARES, 2009). Quando analisada a diversidade de espécies com capacidade de promoção de crescimento em plantas, existe a possibilidade de identificação e isolamento de estirpes para o desenvolvimento de formulações comerciais inoculantes, visando o aumento do crescimento e desenvolvimento vegetal. Para a seleção de BPCVs devem ser seguidos alguns princípios que tenham o objetivo de identificar estirpes que sejam eficientes em condições prevalentes no local de inoculação e competitivas em relação às populações nativas. (RANA et al., 2011).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) tem mostrado uma importante capacidade de estímulo ao crescimento de plantas por mecanismos diretos, como a produção de reguladores de crescimento vegetal (giberelinas, etileno, auxinas e ácido abscísico), solubilização de fosfatos inorgânicos e fixação

biológica de nitrogênio. Mecanismos indiretos de promoção do crescimento vegetal também são descritos, como produção de sideróforos, proteção contra estresses biótico e abiótico, controle biológico de pragas e indução de resistência local e sistêmica (LODEWYCKX et al., 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; OLIVARES, 2009; SINGH et al., 2011; SANTI et al., 2013).

Organismos do gênero *Pseudomonas*, por exemplo, são de um grupo heterogêneo e com uma grande versatilidade metabólica, que possibilita o uso de uma ampla faixa de substratos como fonte de carbono por estes microrganismos. Algumas espécies desse gênero são diazotróficas e se mostram menos limitadas em relação à fonte de energia em comparação com outros microrganismos diazotróficos. Em algumas plantas, as espécies diazotróficas desse gênero costumam ser dominantes na rizosfera (CHEN et al., 1994). Bactérias que apresentam mais de uma característica na promoção do crescimento vegetal, como capacidade de produção de auxinas e sideróforos ou capacidade de solubilização de fosfatos e fixação de nitrogênio são desejadas para pesquisas de possíveis aplicações no campo, com o objetivo de obter aumento na produção agrícola (VERMA et al., 2001).

Para a utilização de BPCVs na produção vegetal podem ser utilizadas duas estratégias básicas: A primeira estratégia é a ativação de comunidades microbianas nativas pelo manejo do solo e ambiente, e outra se baseia no isolamento de microrganismos alvos e reinoculação dos mesmos após a realização de ensaios experimentais para seleção de estirpes de elite (OLIVARES, 2009).

Portanto, as BPCVs estão presentes na rizosfera, no rizoplano e interior da planta hospedeira, representando uma parcela funcionalmente ativa da biota do solo. Assim, a inoculação de bactérias benéficas na agricultura diminui a utilização de insumos químicos, como pesticidas e fertilizantes, causando efeito direto na economia e na sustentabilidade dos sistemas agrícolas (JALGAONWALA et al., 2011).

4.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é constituinte obrigatório de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos e participa direta e indiretamente de inúmeros processos bioquímicos nas plantas. Na atmosfera, o nitrogênio constitui o gás encontrado em maior concentração, totalizando em torno de 78% do total, porém ocorre

predominantemente na forma de N_2 , um gás inerte que não sofre reações químicas em condições naturais. Em solos é encontrado principalmente em sua forma orgânica, como constituinte de biomoléculas resultantes de processos como a decomposição e a excreção, porém pode ser encontrado também em sua forma mineral, como nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+) e nitrito (NO_2^-) (FAGERIA et al., 2003).

O conteúdo de nitrogênio presente no solo é limitado e pode ser rapidamente esgotado depois de determinado número de cultivos. As condições de elevada temperatura e umidade, predominantes na maior parte do Brasil, também interferem no processo de decomposição da matéria orgânica, causando perdas de N e trazendo como consequência, solos com baixo teor desse nutriente (HUNGRIA et al., 2001).

São quatro as fontes pelas quais a planta pode receber doses de nitrogênio: (1) o solo, geralmente pela decomposição de matéria orgânica; (2) a fixação não biológica, através de descargas elétricas, vulcanismo e combustão; (3) fertilizantes nitrogenados; (4) o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (HUNGRIA et al., 2001).

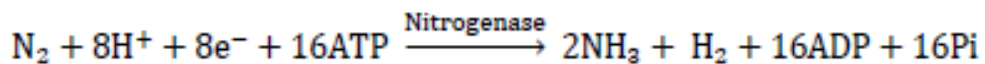
A forma pela qual a assimilação de N pelas plantas ocorre mais rapidamente é pelo uso de fertilizantes nitrogenados, porém esse processo possui um custo muito elevado, já que sua produção industrial requer hidrogênio derivado de petróleo, catalisadores que contenham ferro, altas temperaturas ($300\text{ }^\circ\text{C}$ a $600\text{ }^\circ\text{C}$) e altas pressões (200 a 800 atm). Além disso, uma grande parte dos fertilizantes aplicados aos cultivos acaba não sendo absorvida pelas plantas, pois é perdida em pouco tempo por processos de lixiviação e transformação em formas gasosas por desnitrificação e volatilização (HUNGRIA et al., 2007).

Outro efeito negativo do uso de fertilizantes é a poluição ambiental, decorrente do uso indiscriminado desses produtos, podendo atingir níveis tóxicos tanto ao homem quanto a outros organismos e ao meio ambiente. O transporte desse nutriente pela superfície do solo leva-o até as águas de rios, causando o processo de eutrofização, que é o enriquecimento dessas águas com tais nutrientes causando crescimento excessivo de plantas aquáticas e degradação da qualidade água (BRAGA et al., 2006)

Outra fonte de N para plantas resulta da fixação biológica do N_2 (FBN), processo que pode ser realizado por inúmeras espécies de bactérias habitantes do solo (HUNGRIA et al., 2001). O processo da FBN é fundamentado na característica

metabólica de microrganismos, denominados fixadores de nitrogênio (diazotróficos), que utilizam o complexo enzimático da nitrogenase para quebrar a tripla ligação existente entre dois átomos de nitrogênio atmosférico (N₂), transformando-o em amônia (NH₃) que pode ser assimilado em compostos biológicos (REIS JUNIOR et al., 2011).

A primeira bactéria diazotrófica foi descrita em 1893 e denominada como rizóbio, por pertencer ao gênero *Rhizobium*. A partir disso diversos estudos foram conduzidos e uma ampla literatura foi produzida (REIS et al., 2006). A enzima nitrogenase é a responsável pelo processo denominado fixação biológica de nitrogênio e funciona em sistemas com baixa aeração e baixos níveis de N, fornecendo esse nutriente para que seja facilmente utilizado pelas plantas (SAIKIA et al., 2012; WHITE-JR et al., 2012). A reação catalisada pela nitrogenase pode ser resumida da seguinte forma:



A nitrogenase é uma enzima constituída por dois componentes: uma subunidade que contém molibdênio e ferro (MoFe-proteína), onde ocorre a redução de N₂ e outra subunidade contendo ferro (Fe-proteína), local onde ocorre transferência de um doador de elétrons para a enzima nitrogenase (SANT'ANNA et al., 2011). Existem alguns microrganismos com a presença de uma subunidade redutora alternativa a MoFe, na qual o molibdênio é substituído por átomos de vanádio (VFe-proteína) ou ferro (FeFe-proteína) (BOYD; PETERS, 2013).

O amônio resultante da redução de dinitrogênio posteriormente é assimilado sob a forma de glutamina, em uma reação catalisada pela glutamina sintetase, que será utilizada pelas plantas para a síntese de aminoácidos (HAYWARD et al. 2009). Atualmente, a utilização de inoculantes microbianos contendo estirpes diazotróficas compreende uma tecnologia utilizada para a melhoria da produção agrícola, e é apresentada como uma metodologia sustentável, podendo diminuir significativamente o uso de fertilizantes químicos em crescente utilização nas últimas décadas (JAMES; BALDANI, 2012).

Em organismos diazotróficos, tanto em associação com plantas como em vida livre, a capacidade de fixação de nitrogênio é ligada a atividade da nitrogenase, que

é um complexo enzimático e possui como centro funcional a combinação de proteínas codificadas pelos genes *nifHDK*. Esse complexo da nitrogenase tem capacidade de promover o rompimento da tripla ligação de átomos de nitrogênio usando energia obtida por processos fotossintéticos e quimiossintéticos, ou ainda obtida a partir de metabolismo de carboidratos em forma de ATP, pela fermentação ou respiração (ZEHR et al., 2003). O conjunto de genes *nif* (relativos a *nitrogen fixation*) foi identificado primeiramente em *Klebsiela pneumoniae* e são responsáveis por determinar a regulação da nitrogenase e sua estrutura (CANNON et al., 1976).

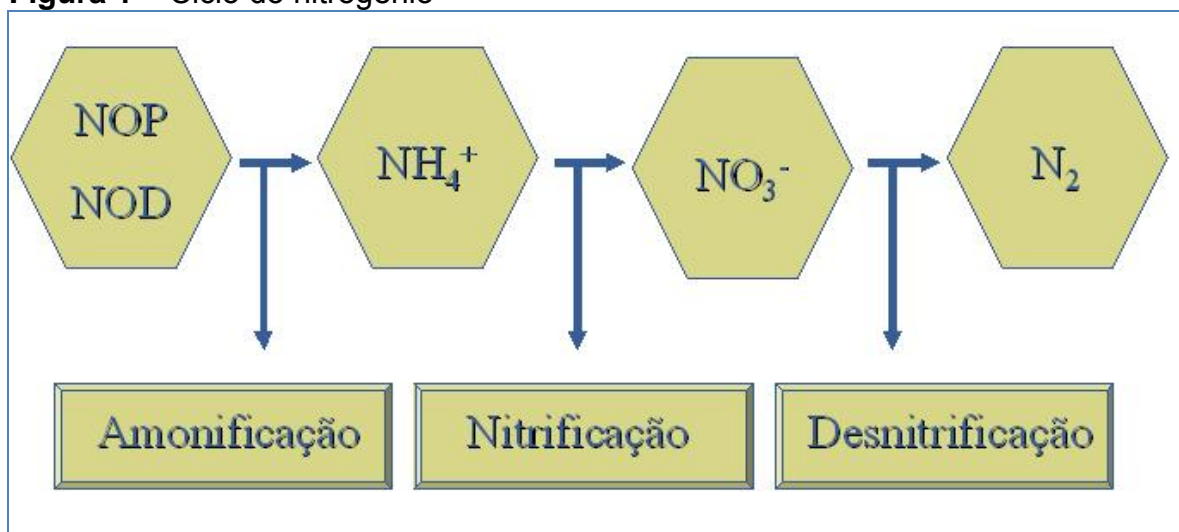
Além das subunidades MoFe-proteína (codificada pelos genes *nifDK*) onde ocorre a redução de N_2 , e a subunidade Fe-proteína (codificada pelo gene *nifH*) local onde ocorre a transferência de um doador de elétrons para a enzima nitrogenase (SANT'ANNA et al., 2011), uma terceira molécula transportadora de elétrons é utilizada durante a redução do N_2 . Essa molécula é a ferredoxina, e é responsável pela transferência de um elétron para a unidade Fe-proteína da nitrogenase, que se torna reduzida e doa o elétron recebido para a subunidade MoFe-proteína. Após o acúmulo de oito elétrons, a enzima nitrogenase fará a redução do N atmosférico à amônia. A amônia (NH_3^+) é rapidamente convertida a amônio (NH_4^+) logo que entra em contato com o substrato aquoso do citoplasma bacteriano. O amônio, por sua vez, atua inibindo o processo de FBN e é uma molécula que promove toxidez celular, e portanto deve ser transportado para fora do ambiente celular ou assimilado em forma de glutamina, por meio da glutamina sintetase (CARDOSO, 1992; HAYWARD et al. 2009).

O potencial de FBN dos microrganismos diazotróficos pode ser regulado por diversos fatores, e pode ocorrer em três níveis: transcrição/tradução, pós-tradução e compartimentalização. A sensibilidade da enzima nitrogenase aos níveis de oxigênio e amônio são exemplos de regulação pós-traducional. A alta sensibilidade da enzima nitrogenase a oxigênio traz a necessidade de criação de mecanismos de defesa por parte dos microrganismos. Em plantas leguminosas, além do córtex do nódulo, existem leghemoglobinas que agem sequestrando o oxigênio do meio, diminuindo a concentração deste e evitando a inibição da nitrogenase (DIXON; KAHN, 2004). Já em bactérias diazotróficas que não realizam simbiose, a presença de amônia é o ponto mais determinante na regulação e expressão enzimática da nitrogenase, pois uma alta concentração de amônia inibe a atividade da mesma (HALBLEIB; LUDDEN, 2000).

4.4 ASSIMILAÇÃO DE N EM BACTÉRIAS

Apesar de a FBN ser responsável por 90% da entrada do nitrogênio no ciclo biogeoquímico, existem outros processos pelo qual este elemento pode ser disponibilizado no solo. No ciclo do N existem quatro mecanismos diferentes e importantes: (1) Fixação biológica de nitrogênio; (2) Amonificação; (3) Nitrificação; (4) Desnitrificação (BUCHANAN et al. 2000).

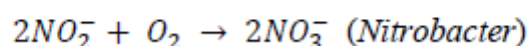
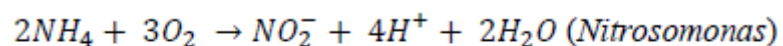
Figura 1 – Ciclo do nitrogênio



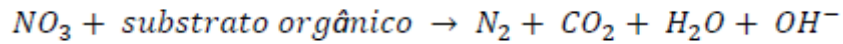
Fonte: (BUCHANAN et al. 2000)

No processo de amonificação ocorre a mineralização do N orgânico encontrado na biomassa, resíduos e substâncias húmicas do solo, sendo transformado em $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3^-$. Todo o nitrogênio orgânico utilizado no processo é encontrado na forma de amina, amida ou imidas, e o primeiro produto da mineralização é sempre o N-amoniacal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; CANTARELLA, 2007).

A nitrificação é o processo de oxidação da amônia a nitrato sob condições aeróbias, onde existe a formação de nitrito como intermediário. A conversão de amônia a nitrito pode ser realizada por espécies de bactérias do gênero *Nitrosomonas*, e a conversão de nitrito a nitrato por sua vez pode ser mediada por espécies do gênero *Nitrobacter* (ECKENFELDER, 1989; WEF et al., 2005), de acordo com as seguintes equações:



A desnitrificação consiste em um processo de redução de nitratos ou nitritos a Nitrogênio molecular em ambiente com pouco ou nenhum oxigênio dissolvido. Nesse caso, as bactérias utilizam oxigênio dos nitratos e nitritos para metabolizar estruturas celulares (ECKENFELDER, 1989; ELEFSINIOTIS *et al.*, 2004; WEF *et al.*, 2005).



O processo de desnitrificação é realizado por uma enorme variedade de microrganismos heterotróficos, que obtém energia a partir de fonte de carbono orgânico. Essa grande variedade de microrganismos é explicada pelo fato de utilizarem nitrato e nitrito como fontes de oxigênio molecular além do O₂ (WEF *et al.*, 2005; USEPA, 2009).

4.5 GLUTAMINA-SINTETASE

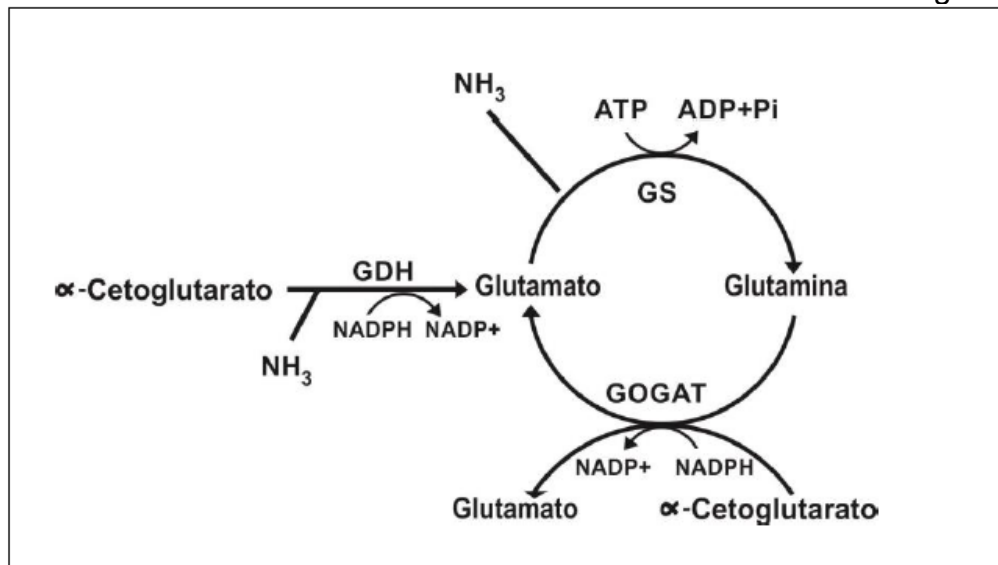
A enzima Glutamina Sintetase (GS) está envolvida na via de assimilação primária de amônio nas plantas superiores. Esta enzima catalisa a reação do glutamato oriundo do ciclo de Calvin e o NH₄⁺ em glutamina. A principal forma encontrada em raízes de plantas é a GSI, localizada no citosol. A GSII, quando encontrada é localizada nos plastos/cloroplastos (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

Além da glutamina sintetase, existe outra enzima responsável pela assimilação do nitrogênio. Essa enzima é a nitrato redutase (NR), responsável por catalisar o primeiro passo para assimilação de nitrato. A expressão da NR é induzida por nitrato de forma rápida em diversas plantas. O *nia2* é um dos dois genes que codificam a redutase do nitrato em plantas, e é expresso em folhas verdes na maioria das vezes. Cerca de 90% de toda atividade de NR da planta é de responsabilidade do gene *nia2*, enquanto *nia1* é um gene constitutivo responsável pela atividade residual, correspondente a 10% da atividade enzimática (PRICE *et al.*, 2004; GOJON *et al.*, 2009).

Em bactérias, a GS é responsável por adicionar amônia ao grupamento γ-carboxil do glutamato com a finalidade de produzir glutamina (CASTRO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011). A produção do glutamato é realizada por uma reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), mediada pela conversão de α-cetoglutarato e amônia ou pelo ciclo da glutamina sintetase/glutamato sintetase (GS/GOGAT) (Figura 1), onde ocorre a produção de glutamina que posteriormente

participa de uma reação de transaminação com o α -cetogluturato, produzindo duas moléculas de glutamato (YUAN et al., 2009). A GS é altamente regulada e depende de ATP para catalisar a síntese da glutamina a partir de glutamato e amônia. A reação catalisada pela glutamina sintetase é a única via na síntese de glutamina, substrato essencial na síntese de purinas e pirimidinas, alguns outros aminoácidos, ácido *p*-aminobenzóico e glucosamina-6-fosfato (JANSSEN et al. 1982; HAYWARD et al. 2009).

Figura 2 – Ciclo GS/GOGAT: Amônia é assimilada via glutamato desidrogenase GDH ou pelo ciclo glutamina sintase/glutamato sintase onde em cada ciclo GS/GOGAT uma molécula de amônia é assimilada em glutamato.



Fonte: (YUAN et al, 2009).

A produção de glutamato ocorre através de duas vias. Na primeira existe uma enzima NADP-dependente que é codificada pelo gene *gdh1* e *gdh3*, sendo responsável pela síntese de glutamato a partir de α -cetogluturato e a segunda é uma enzima NAD-dependente que é codificada pelo gene *gdh2*, que catalisa a transferência de amônia para glutamato produzindo glutamina (TANG et al, 2011). Enzimas GDH que catalisam aaminação reversível do α -cetogluturato na formação de glutamato se envolvem em processos entre o ciclo de Krebs e o metabolismo de nitrogênio, onde enzimas NADP⁺ podem sofrer regulação transcricional de acordo com condições ambientais, principalmente em condições limitantes no fornecimento de carbono e nitrogênio (HARPER et al., 2010). Enzimas componentes do metabolismo celular de nitrogênio são essenciais na manutenção de inúmeras

reações biossintéticas na célula, onde ocorre a entrada de nitrogênio a partir do glutamato e glutamina, moléculas indispensáveis na biossíntese de nucleotídeos e demais aminoácidos.

4.6 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM ASSOCIAÇÃO A GRAMÍNEAS

As bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, denominadas diazotróficas, podem viver livremente no solo ou em associação com espécies vegetais, tanto endofiticamente, na rizosfera ou formando simbiose, como ocorre em muitas plantas leguminosas. As bactérias diazotróficas associativas são encontradas em inúmeras espécies de plantas não leguminosas, como em milho (BALDANI; BALDANI, 2005; BHATTACHARJEE et al., 2008; HUNGRIA, 2011).

No Brasil, as pesquisas relacionadas à fixação biológica de nitrogênio (FBN) foram iniciadas por Johanna Döbereiner, especialmente em plantas não-leguminosas. Essa pesquisadora alcançou grande expressividade com a descoberta da *Beijerinchia fluminensis* associada à cana-de-açúcar, em 1958, e do *Azotobacter paspali* associada à *Paspalum notatum* cv *batatais*, no ano de 1966. Entre as descobertas que acabaram impulsionando as pesquisas nessa área podem ser citadas a introdução da técnica de redução de acetileno e a utilização de meios de cultura semi-sólidos livres de nitrogênio (BALDANI; BALDANI, 2005).

A importância econômica das gramíneas é o que tem motivado os estudos sobre a associação de bactérias diazotróficas com essas plantas, e o Brasil foi pioneiro no estudo dessas associações (DÖBEREINER, 1992). As bactérias capazes de realizar associações com gramíneas e outras plantas não-leguminosas são denominadas bactérias associativas (REIS et al., 2004).

Gramíneas com grande importância econômica foram identificadas como hospedeiros de diversas espécies de bactérias diazotróficas, sendo as principais *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Dentre essas gramíneas podem ser citadas cana-de-açúcar, trigo, sorgo, arroz e milho. (BALDANI et al., 1997; JAMES; OLIVARES, 1997; JAMES, 2000; BODDEY et al. 2003; BANO et al., 2013;).

RAI et al. (2007) conduziram experimentos com milho em campo e em casa de vegetação, em diferentes estágios de crescimento e encontraram diversas espécies de bactérias no colmo da planta. As espécies predominantemente

encontradas foram *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*. O experimento também mostrou um decréscimo na contagem populacional quando em casa de vegetação, fato esse atribuído a fatores bióticos e abióticos que podem influenciar a colonização dessas bactérias em tecidos vegetais.

Foram encontradas também em abundância, bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* na rizosfera e no rizoplano de plantas de canola (FARINA et al., 2012). Estirpes de *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Curtobacterium* e *Pseudomonas* também foram isoladas de plantas de trigo (STETS et al., 2013).

No processo de FBN entre bactérias diazotróficas e gramíneas, as BPCVs secretam somente parte do nitrogênio necessário para a planta associada, sendo parcialmente suprida a necessidade das plantas. Assim, a inoculação dessas culturas com microrganismos diazotróficos aparentemente não consegue suprir totalmente as necessidades de N necessário para o desenvolvimento das plantas, ao contrário do que ocorre com espécies leguminosas como a soja (HUNGRIA, 2011). No entanto, na cultura de milho, com a substituição parcial de 50% de fertilizantes nitrogenados por biofertilizantes, a economia com a aplicação de N pode chegar a cerca de 52 kg/ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2010).

4.7 PRODUÇÃO DE AUXINAS

Sabe-se que as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico podem formar simbiose com plantas como ocorre em algumas leguminosas, viver livremente no solo, ou ainda estarem associadas às espécies vegetais, tanto na rizosfera como endofiticamente (BALDANI; BALDANI, 2005; HUNGRIA, 2011). Além da fixação biológica de nitrogênio, essas bactérias são importantes também pela produção de hormônios vegetais, influenciando assim o metabolismo de plantas (JAMES; BALDANI, 2012).

Os fitormônios (citocinina, giberelina e auxina) são reguladores de desenvolvimento e crescimento de plantas, interferindo nos processos fisiológicos das mesmas (MARCHIORO, 2005; KUMAR et al., 2012). O ácido indol acético (AIA) é um dos principais hormônios vegetais produzidos, pois induz o crescimento de

raízes e pêlos radiculares, influenciando na maior absorção de água e nutrientes pelas plantas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Dentre as rotas metabólicas descritas para a biossíntese de AIA em bactérias, o aminoácido triptofano aparece como o principal precursor fisiológico para biossíntese deste fitormônio em microorganismos e plantas (RADWAN et al., 2005; SPAEPEN et al., 2007). Os microorganismos possuem quatro rotas metabólicas principais para sintetizar AIA a partir de triptofano. Essas vias são classificadas de acordo com os seus compostos intermediários, como triptamina (TAM), indol-3-acetonitrila (IAN), ácido indol-3-pirúvico (IpyA) e indol-3-acetamida (IAM) (LEHMANN et al., 2010).

Dentre as rotas dependentes de triptofano, a via do indol-3-acetamida (IAM) ocorre primeiramente na conversão de triptofano para indol-3-acetamida mediada pela enzima denominada 'triptofano-2-monoxigenase', codificada pelo gene *laaM*. O processo seguinte é a conversão de IAM em AIA, mediada pela enzima indol-3-acetamida hidrolase, codificada pelo gene *laaH*. Os genes *laaM* e *laaH* normalmente são organizados em operon e são altamente conservados em inúmeras espécies de bactérias (TSAVKELOVA et al., 2012; LIN; XU, 2013).

Estudos demonstram a importância do AIA no desenvolvimento vegetal, assim como indicam sua importância em eventos de nodulação. Ensaio realizado com co-inoculação de *Azospirillum* e *Rhizobium* em feijoeiro indicaram um número maior de nódulos, maior quantidade de nitrogênio fixado e maior produtividade. Em contrapartida, o uso de uma estirpe mutante de *Azospirillum* para o gene *ipdC*, onde a produção de AIA é de apenas 10% trouxe resultados insatisfatórios, demonstrando a grande importância do AIA bacteriano na eficiência da simbiose (REMANS et al., 2008).

4.8 MUTAGÊNESE INDUZIDA

A mutação é definida como qualquer alteração herdável com capacidade de alterar a informação genética de um organismo. Essas alterações podem ser sofridas por quaisquer componentes primários do DNA, como resíduos de pentose, bases nitrogenadas e ligações fosfodiéster. Os danos no genoma são dependentes da natureza química da alteração em relação à estrutura do DNA, e as principais alterações herdáveis compreendem grandes rearranjos em sequências por inserção,

deleção ou substituição de fragmentos, em alterações pontuais nas bases nitrogenadas (BRAY; WEST, 2005).

Normalmente, os organismos são submetidos a determinado nível de mutações, denominadas mutações espontâneas, que são resultados de funções celulares normais ou interações aleatórias com o ambiente. Essas mutações ocorrem em uma baixa frequência e são dependentes da eficiência dos mecanismos celulares desenvolvidos pelos organismos durante a evolução para o reconhecimento e eliminação de danos (BRAY; WEST, 2005). A taxa de mutação espontânea é baixa e a frequência da ocorrência de mutações em microrganismos pode ser aumentada pela utilização de agentes com capacidade de causar alterações no DNA, denominados agentes mutagênicos (tratamentos químicos como substâncias alquilantes, ou tratamentos físicos como as radiações ionizantes) (VAN HARTEN, 1998; PREDIERI, 2001).

A mutação aleatória é empregada em grande escala para o melhoramento genético de linhagens para fins industriais, pois poucas indústrias utilizam cepas selvagens em seus processos de produção. A modificação genética das linhagens pode ser realizada de duas maneiras: através da produção de DNA recombinante ou através da utilização de agentes mutagênicos, que permite criar genótipos diferentes partindo de uma célula original através de alterações aleatórias nos genes (CONTADO, 1998; TAPIA, 2012). A vantagem da técnica de mutagênese aleatória é que não há necessidade de conhecimento prévio da estrutura genética para que seja realizada a introdução de mutação no DNA alvo, consistindo na avaliação e triagem de microrganismos avaliando-se o fenótipo (WONG et al., 2004; LUHE et al., 2010).

Além disso, os microrganismos mutantes obtidos por esse tipo de mutação não são considerados organismos geneticamente modificados, pois os microrganismos não sofrem nenhuma modificação gênica por técnicas de engenharia genética, sendo facilitada a disponibilização comercial. Por lei, OGM é qualquer organismo cujo material genético – DNA/RNA – tenha sido modificado por qualquer técnica de Engenharia Genética. No artigo 6º, inciso I, da lei Vigente, é proibida a implementação de projeto relativo à OGM sem a manutenção de registro de seu acompanhamento individual (BRASIL, 2005). Porém, no artigo 4º, Inciso I, da lei vigente, é permitido o melhoramento genético através da mutagênese (BRASIL, 2005).

Assim, a obtenção em laboratório de estirpes de microrganismos com características melhoradas pode ser feita com a utilização de agentes mutagênicos físicos ou químicos (SHI et al., 2009; STANLEY et al., 2010).

4.9 AGENTES MUTAGÊNICOS FÍSICOS

Os agentes físicos utilizados para a indução de alterações na informação genética são radiações que possuem determinados comprimentos de onda e energia. As radiações podem ser ionizantes ou não ionizantes. As radiações ionizantes induzem a ionização de átomos ou moléculas da matéria ao atravessá-la, e podem ser não particuladas como os raios-X, ou particuladas como irradiações α (alfa), β (beta) e γ (gama). A radiação ionizante é formadora de radicais livres na célula quando interage com átomos ou moléculas e esses radicais podem destruir ou modificar componentes celulares importantes, dependendo do nível de radiação. Se não ocorrer o reparo antes da replicação do DNA, essas modificações podem resultar em mutações herdáveis (VONARX et al., 1998; KIM et al., 2004).

A radiação não ionizante consiste em um aumento no nível de energia do átomo, que o torna menos estável (KELLER et al., 2004, WANG et al., 2009). A radiação ultravioleta em 260 nm tem seu efeito germicida atuando em máxima eficiência, causando dimerização de bases nitrogenadas em ácidos ribonucleicos (RNA) e desoxirribonucleicos (DNA). A replicação do DNA alterado pela incidência de exposição à luz UV pode gerar mutações pontuais por substituição de bases. A luz UV induz um padrão de mutação onde ocorre a conversão de uma citosina em timina, em sítios dipirimídicos (IKEHATA; ONO, 2011). Essa luz ultravioleta é capaz de gerar estirpes com melhor desempenho em determinadas funções quando comparadas as estirpes selvagens, dependendo do método de seleção das células sobreviventes após a utilização do agente mutagênico (PIGATTO, 2008).

A lâmpada germicida é a fonte de radiação mais utilizada para a indução de mutagênese física. Essa lâmpada emite grande quantidade de radiação na faixa de 260 nm. As doses de radiação UV utilizadas promovem entre 90 e 95% de mortes na população celular, sendo os mutantes rastreados entre os sobreviventes (MADIGAN et al., 2004).

4.10 AGENTES MUTAGÊNICOS QUÍMICOS

A mutagênese química aleatória também compreende uma técnica capaz de gerar mutantes com capacidades fisiológicas e bioquímicas alteradas em relação às estirpes selvagens (MOBINI-DEHKORDI, 2008). Essa técnica utiliza agentes mutagênicos com o intuito de induzir modificações aleatórias dentro do material genético (MEDINA, 2010).

Existem vários grupos de compostos químicos com capacidade de indução de mutação: (1) compostos com composição química semelhante a bases nitrogenadas do DNA, e que podem induzir erros no pareamento como o 5-bromouracil e 5-bromodeoxiuridina; (2) antibióticos que podem causar quebras nos cromossomos, como actinomicina D, estreptomicina e mitomicina C; (3) agentes alquilantes que reagem com DNA, como etil-metano-sulfonato (EMS) e metil-metano-sulfonato (MMS), etilenimina, 1-metil-3-nitro-1-nitroso-guanidina (MNNG) entre outros (TULMANN NETO et al., 1998).

Uma extensa gama de alterações no DNA pode ser provocada por esses agentes químicos, como a ocorrência de mutações pontuais por alquilação de bases, dificultando o mapeamento e caracterização da mutação no genoma (GREENE et al., 2003). Agentes químicos também podem ocasionar a troca de segmentos entre cromátides-irmãs ou substituição de átomos de carbono ou nitrogênio reativos entre estruturas de bases (VONARX et al., 1998). Agentes alquilantes podem induzir também a formação de N3-alkil-adenina, altamente citotóxica e que não é reconhecida pela DNA polimerase, bloqueando a replicação do DNA (BRITT, 1999).

O EMS induz aumento na frequência de substituições de nucleotídeos por transferência de radicais alkil para bases guanina no DNA, dando origem a O6-metilguanina, e provocando erro no pareamento. O radical alkil induz pareamento de G com T, resultando em mutações do tipo transição de G/C para T/A (ROGOZIN et al., 2001; GREENE et al., 2003). Da mesma forma, o metil-metano-sulfonato (MMS) também é um agente alquilante, e sua reação com o genoma causa metilação na base nitrogenada guanina induzindo ao pareamento desta base com adenina, resultando na indução de transições G/C para A/T (FURLAN et al., 2002; ANTONIO, 2012).

4.11 MUTANTES EXCRETORES DE AMÔNIO

A mutação aleatória permite a obtenção de uma coleção de estirpes mutantes com diferentes tipos de modificação genotípica e fenotípica, sendo assim necessário uma etapa de triagem para a seleção das estirpes de interesse. Para a identificação de mutantes de bactérias diazotróficas com maior capacidade de excreção de amônio, vários trabalhos têm usado substâncias análogas ao amônio, como a etilenodiamina (EDA), que atua inibindo a atividade da enzima glutamina sintetase (GS), e possibilita a identificação de mutantes com capacidade de realizar a FBN sob elevadas concentrações de amônio (CHRISTIANSEN, 1991).

Inibidores da atividade enzimática da glutamina sintetase, como o composto L-metionina-D, L-sulfoximina (MSX), foram utilizados em outros experimentos, indicando a possibilidade de rastreamento de microrganismos com capacidade de excreção de amônio quando bloqueada a atividade da enzima GS (BUI et al., 2014).

Bui et. al. (2014), em estudos com uma cianobactéria denominada *Anabaena variabilis*, obtiveram uma estirpe mutante com capacidade de excreção de amônio incrementada após duas rodadas de mutagênese com o agente etil-metano-sulfonato (EMS). Após a indução da mutagênese, as estirpes mutantes foram inoculadas em meio de cultura com a presença de um inibidor da atividade enzimática da glutamina-sintetase, denominado L-metionina-D,L-sulfoximina (MSX) (BUI et al., 2014).

Algumas estirpes de *Azospirillum brasilense* com mutações na enzima GS apresentam capacidade de excreção de amônio aumentada em comparação à estirpe selvagem (*A. brasilense* Sp7), sendo que o mutante *A. brasilense* 7028 apresentou 18% na atividade da enzima GS quando comparado à estirpe selvagem, sem que houvesse diminuição de sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (DOMMELEN et al.; 2003). Em adição, as estirpes mutantes HM14, HM26, HM053 e HM210 de *A. brasilense*, derivadas da estirpe selvagem Sp7, foram caracterizadas como mutantes excretoras de amônio, e selecionadas pela resistência a EDA (MACHADO, 1988).

As mutações em bactérias resistentes as EDA estão localizadas frequentemente em regiões do gene *glnA* (SRIVASTAVA; TRIPATHI, 2006). Essa mutação afeta parcialmente o sistema regulador da atividade do complexo enzimático da nitrogenase, que não se demonstra inibida pelo excesso de amônio.

Outras características fisiológicas também podem ser afetadas, como a ausência de crescimento em meio de cultivo contendo apenas nitrato, a capacidade de excreção de altos níveis de amônio, a ocorrência de alterações no perfil de adenilação da enzima GS, e alterações no transporte de amônio e na atividade da GS (MACHADO, 1988). A liberação de amônio por estirpes mutantes de bactérias diazotróficas resistentes ao EDA parece estar relacionada com a quantidade de nitrogênio que a enzima GS pode assimilar, que se torna diminuída pela diminuição na atividade da enzima em decorrência dos maiores níveis de adenilação da GS, acarretando na diminuição da capacidade de incorporação de amônio ao glutamato (SRIVASTAVA; TRIPATHI, 2006).

5 METODOLOGIA

5.1 ESTIRPE UTILIZADA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O isolado bacteriano utilizado neste estudo foi uma estirpe denominada 4.3.1.1 de *Azomonas* sp., que foi obtido da Coleção de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (CBPCV-UEL), mantida pelo Laboratório de Bioquímica Molecular do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina. Este isolado compunha a comunidade nativa de solos sob uso agrícola, sendo recuperado em meio de cultivo semi-sólido JMV (Anexo A) a partir da comunidade da rizosfera do híbrido comercial de milho AG 2040 (Agroceres/Monsanto). Foi caracterizado como promotor do crescimento de milho, com base em características bioquímicas do microrganismo e no incremento (32,5%) sobre o desenvolvimento inicial de milho (COSTA, 2013). Os parâmetros de crescimento utilizados para a seleção de mutantes em meio de cultivo JMV líquido (Anexo A), que utiliza manitol como fonte de carbono, foram os seguintes: incubação a 28°C por 144 horas, adição de 10 mM de ácido glutâmico como fonte de nitrogênio, e ausência de agitação orbital.

5.2 INDUÇÃO DE MUTAGÊNESE ALEATÓRIA

Foram aplicadas metodologias física e química para a indução de mutagênese aleatória na estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas* sp. Para a mutagênese física, cultivos celulares na concentração de 5×10^9 UFC/mL foram expostos por diferentes tempos (0, 5, 10, 20, 30 e 40 segundos) à radiação ultravioleta no comprimento de onda de 260 nm, em uma caixa de luz UV preparada para indução de mutagênese. Para a mutagênese química, cultivos celulares na concentração de 5×10^9 UFC/mL foram expostos a diferentes concentrações do composto metil-metano-sulfonato (MMS) (0, 2, 4, 6, 8 e 10 mM) durante meia hora em B.O.D. a 28 °C. Em seguida, as células provenientes deste tratamento foram submetidas a dois processos de lavagem com tampão fosfato (Anexo B) e centrifugação (15.000 rpm por 10 minutos) para retirada do MMS.

Após exposição dos cultivos celulares aos tratamentos de indução de mutagênese, um volume de 100 µL de cada cultivo mutagenizado foi plaqueado em

meio JMV sólido em triplicata por tratamento, sendo realizada a construção da curva de sobrevivência para cada tratamento, por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após três dias de incubação a 28°C. A partir da construção das curvas de sobrevivência para os diferentes tratamentos, foram definidos os parâmetros de indução de mutagênese para a estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas* sp.

Foram também realizados experimentos para construção de uma curva de tolerância ao composto etilenodiamina (EDA). Para alcançar este objetivo, foram testadas diferentes concentrações de EDA (1,5; 7,5; 11; 15; 22,5; 30; 45; 60 e 75 mM) aplicado sobre o meio de cultivo JMV sólido. Cultivos celulares de *Azomonas* sp. 4.3.1.1 com concentração inicial de 5×10^3 UFC/mL foram inoculados em placas de Petri com meio JMV acrescido de EDA nas diferentes concentrações, e determinou-se o número de UFC após três dias de incubação a 28°C. A partir da construção da curva de tolerância ao EDA, foi definida concentração deste composto a ser utilizada para identificar os mutantes com possível alteração na capacidade diazotrófica.

Após a definição das condições ideais para indução de mutagênese e seleção dos mutantes de interesse, colônias puras do microrganismo alvo foram inoculadas em meio líquido de cultura denominado meio L (Anexo C), e após 24 horas de crescimento a 28 °C sob agitação orbital de 180 rpm, a concentração de células foi ajustada por leitura espectrofotométrica para uma D.O. 600 nm de 0,5. Alíquotas de 1,0 mL destas suspensões foram submetidas à indução de mutagênese aleatória pelos diferentes métodos testados, físico e químico, e por um método combinado (mutagênese física seguida de mutagênese química) do mesmo modo que foram realizados individualmente. No total foram realizados cinco experimentos em cada processo para a indução de mutação na estirpe 4.3.1.1., seguindo os três processos de mutagênese: Indução de mutagênese por processo físico, indução de mutagênese por processo químico e indução de mutagênese por processo combinado, ou seja, aplicação do processo físico seguido do processo químico seguindo as condições de indução pré-definidas para cada processo.

Após a aplicação dos tratamentos de indução de mutagênese, alíquotas de 100 µL das suspensões celulares tratadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio L adicionado de 30 mM do agente de seleção EDA, e incubadas por três dias a 28°C para o aparecimento das colônias contendo os mutantes com alteração no metabolismo do nitrogênio. Foram inoculadas 30 placas de Petri para

cada tratamento, totalizando 90 placas por experimento. Após estes experimentos, os mutantes selecionados foram repicados para novas placas de Petri contendo meio L adicionados de 15 mM de EDA para comprovação da resistência ao EDA. As estirpes mutantes selecionadas foram cultivadas em meio JMV líquido por 24 horas sob agitação orbital (180 rpm) e temperatura controlada (28°C), sendo em seguida preparadas para criopreservação pela adição de 1 volume de glicerol aos cultivos, e armazenados na CBPCV-UEL.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE AMÔNIO

As estirpes que apresentaram resistência à concentração de EDA definida para a etapa de seleção de mutantes foram submetidas à avaliação quantitativa da excreção de nitrogênio amoniacal para identificar aquelas com potencial capacidade diazotrófica melhorada. Em adição, foram realizados testes bioquímicos (produção de AIA e determinação da concentração de proteínas em cultivos) para avaliação fisiológica comparativa dos mutantes com a estirpe selvagem, buscando a ocorrência de outros fenótipos possivelmente alterados em decorrência dos tratamentos de indução de mutação.

As colônias selecionadas pela resistência ao EDA foram avaliadas quanto à capacidade de excreção de amônio por meio de uma reação colorimétrica definida por Page et al. (1982). Para estas avaliações, as células foram crescidas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio JMV adicionado de 10 mM de ácido glutâmico. Os cultivos foram conduzidos sob incubação a 28°C por 144 horas, na ausência de agitação. Ao final do período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 9.000 rpm por 10 minutos para sedimentação da biomassa celular e obtenção do extrato livre de células (ELC). Para a quantificação do amônio excretado pelos mutantes, 10 mL do ELC de cada isolado selecionado foi adicionado de 0,4 mL do reagente 1 (1g de fenol em 10 mL de etanol 95%), 0,4 mL do reagente 2 (0,1 g de nitroprussiato de sódio em 20 mL de água destilada), e 1 mL do reagente 3 (2 g de citrato trisódico, 0,1 g de hidróxido de sódio, 10 mL de água destilada e 2,5 mL de hipoclorito de sódio comercial (teor de cloro ativo de 2,5 % p/p). Após três horas de reação em ambiente escuro e sem agitação, o N amoniacal presente na solução forma um composto com coloração azul, sendo a intensidade medida a 630 nm em espectrofotômetro. A quantidade de N amoniacal foi determinada utilizando uma

curva padrão com concentrações crescentes (50 a 1000 $\mu\text{g NH}_4 \text{ L}^{-1}$) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com intensidade medida a 630 nm. As determinações foram realizadas com três réplicas, cada uma com três replicatas.

5.4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS (ÁCIDO INDOLACÉTICO)

A produção de compostos indólicos pelos isolados mutantes selecionados foi determinada pela aplicação do ensaio colorimétrico de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995), com modificações (BAUTISTA; GALLARDO, 2008). As células foram cultivadas em 5 mL de meio líquido Dygs acrescido de DL-triptofano ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), mantidos por 48 horas a 28°C sem agitação. Ao final do período de cultivo, uma alíquota de 2 mL de células de cada isolado foi centrifugada a 9.000 rpm por 5 minutos, obtendo-se o extrato livre de células utilizado na reação. Para a quantificação da concentração de compostos indólicos, 0,5 mL do ELC foi transferido para tubos de ensaio e adicionado de 1,0 mL do reagente de Salkowski modificado (FeCl_3 40 mM; H_2SO_4 7,9 M). Após 30 minutos de reação no escuro, a concentração de compostos indólicos foi determinada por espectrofotometria a 540 nm, utilizando uma curva padrão com concentrações crescentes (0 a $100 \mu\text{M mL}^{-1}$) de ácido-3-indol acético sintético. As determinações foram realizadas com três réplicas, cada uma com três replicatas.

5.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas foi determinado nos cultivos utilizados para a quantificação de amônio e compostos indólicos, com o objetivo de normalizar as leituras para os diferentes isolados avaliados. Para esta finalidade, a biomassa celular sedimentada na etapa de obtenção do ELC, foi adicionada 10 mL de solução de NaOH 0,1M nos tubos utilizados na quantificação de amônio e de 2 mL nos tubos utilizados para quantificação de compostos indólicos. As amostras foram agitadas e incubadas por 30 min a 90°C para lise celular, utilizando o material lisado para determinação da concentração de proteínas seguindo o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Brevemente, alíquotas de 0,1 mL do lisado celular foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 1,0 mL de reativo de Bradford diluído 1/5 em água destilada, incubando-se as amostras por cinco minutos em

temperatura ambiente e seguindo a leitura espectrofotométrica a 595nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir de uma curva de calibração construída com concentrações crescentes (10 a 100 µg/mL) de soroalbumina bovina. As determinações foram realizadas com três réplicas, cada uma com três replicatas.

5.6. INCREMENTO NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE MILHO

A capacidade promotora do crescimento de plantas de milho foi avaliada para os isolados mutantes selecionados e para a estirpe selvagem, conforme Costa (2013). Neste ensaio foram utilizadas sementes de milho híbrido P30F53H (Pioneer), previamente desinfestadas. A desinfestação das sementes ocorreu por imersão em solução de etanol 95% (v/v) por 30 segundos, seguida de imersão em solução de H₂O₂ 5% (v/v) por 10 minutos, e finalmente lavadas por seis vezes com água deionizada esterilizada (MARSUDI et al., 1999). Após a desinfestação superficial, 12 sementes de milho foram dispostas em papel germinativo (germitest) umedecido com volume de água destilada esterilizada equivalente a 2,5 vezes o peso do papel (BRASIL, 1992). As sementes destinadas a cada tratamento foram embebidas em solução com concentração determinada de células de modo que cada semente recebeu em torno de 10⁶ células de inóculo bacteriano, e após a inoculação as sementes foram dispostas no papel germitest umedecido para formação dos rolos de germinação, que foram dispostos em sacos plásticos para evitar a perda de umidade (ISTA, 2004). Os ensaios de promoção do crescimento foram estabelecidos com quatro repetições (subamostras contendo 12 sementes para cada tratamento), mantendo os rolos de germinação durante sete dias em câmara climatizada tipo Fitotron, sob regime luminoso de 12:12 horas (luz-escuro), temperatura de 28°C e umidade de 40%.

Após o período de desenvolvimento inicial (germinação), as plantas de milho foram submetidas à análise de alguns parâmetros biométricos. Foram realizadas determinações de peso fresco de parte aérea, peso fresco de raízes, peso seco de raízes, peso seco da parte aérea, e arquitetura do sistema radicular (diâmetro, área, volume e comprimento) pela análise de imagens digitalizadas com auxílio do software GiA Roots (GALKOVSKYI, 2012). As avaliações foram realizadas de maneira comparativa a plantas germinadas na ausência de bactérias, sendo os

dados obtidos submetidos à análise de variância e na existência de diferenças significativas entre tratamentos, foi aplicado o Teste t para a comparação das médias com auxílio do pacote estatístico SASM-Agri (CANTERI, 2001).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. MUTAGÊNESE

As condições ideais utilizadas para a indução de mutagênese aleatória sobre a estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas* sp. estão representadas nas Figuras 2 e 3 e 4.

A Figura 2 apresenta a curva de sobrevivência da estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas* sp. após a exposição por 30 minutos a diferentes concentrações do agente químico alquilante metil-metano-sulfonato (MMS). Com base nos resultados obtidos, foi possível definir uma concentração de 4 mM de MMS, por permitir uma taxa de sobrevivência em torno de 3,20 % de células. A figura 3 apresenta, da mesma forma, a curva de sobrevivência da estirpe 4.3.1.1. de *Azomonas* sp. após sua exposição à radiação ultravioleta por diferentes períodos de tempo. Com base nesta curva, definiu-se que o melhor tempo para exposição à radiação ultravioleta foi de 5 segundos, uma vez que permitiu uma taxa de sobrevivência na faixa de 3,60 % de células. A escolha desses tratamentos (concentração de MMS e tempo de exposição à luz UV) teve como base a taxa de morte mínima necessária para que ocorra a mutação, definida em 90%, estando os mutantes incluídos dentro dos sobreviventes (MADIGAN et al., 2004).

Na figura 4 é mostrada a diminuição no número de Unidades Formadoras de Colônia de acordo com o aumento da concentração de EDA no meio de cultura L sólido. Após esses experimentos a concentração de EDA definida para a etapa de seleção de mutantes foi de 30 mM de EDA líquido, diluído em meio de cultura. A utilização de EDA permite selecionar os mutantes com capacidade reduzida de transporte de amônio para dentro da célula, uma vez que sua incorporação ao glutamato pela enzima GS é inibida; desta forma os microrganismos com capacidade de FBN apresentam aumento na capacidade de excretar o NH_4^+ derivado da fixação de nitrogênio, uma vez que este íon é tóxico à célula (MACHADO et al., 1991). É possível observar pelo gráfico que a partir da concentração de 15 mM de EDA não houve crescimento de células da estirpe selvagem, sugerindo a completa inibição do metabolismo do nitrogênio, pela inibição da atividade da enzima GS, nesta estirpe. Neste sentido, a escolha pela concentração de 30 mM para a etapa de seleção de mutantes com alteração no

metabolismo do nitrogênio foi fundamentada na possibilidade de evitar a seleção de falsos mutantes.

Figura 3 – Taxa de sobrevivência da estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas sp.* após mutação química com agente químico alquilante MMS (metil-metano-sulfonato) em exposição por 30 minutos e crescimento por 72 horas em meio JMV sólido a 28 °C.

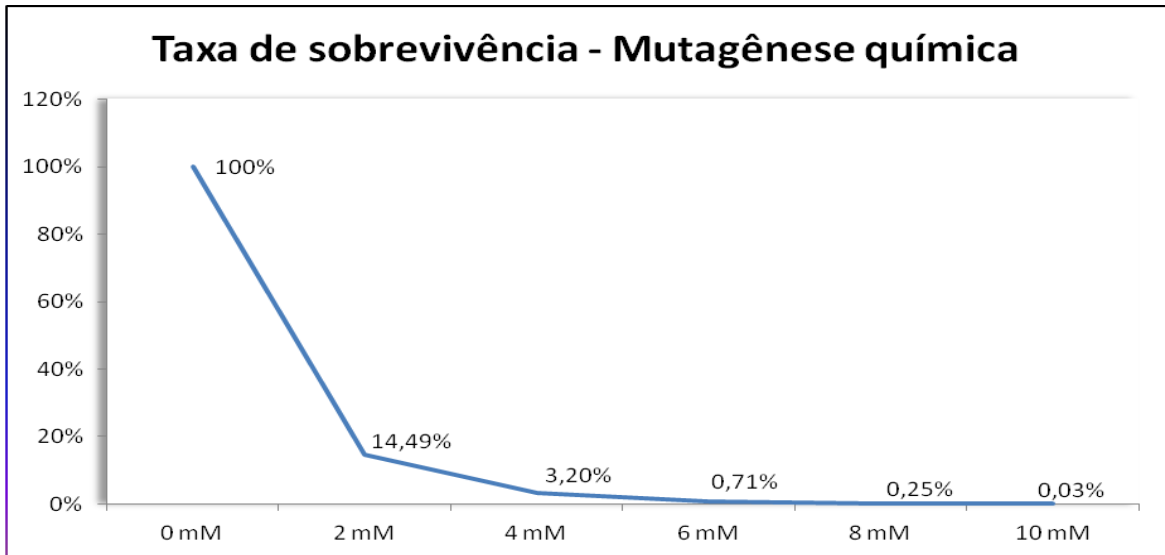


Figura 4 – Taxa de sobrevivência da estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas sp.* após mutação física por exposição à radiação ultravioleta com comprimento de onda de 260 nm e crescimento por 72 horas em meio JMV sólido a 28 °C.

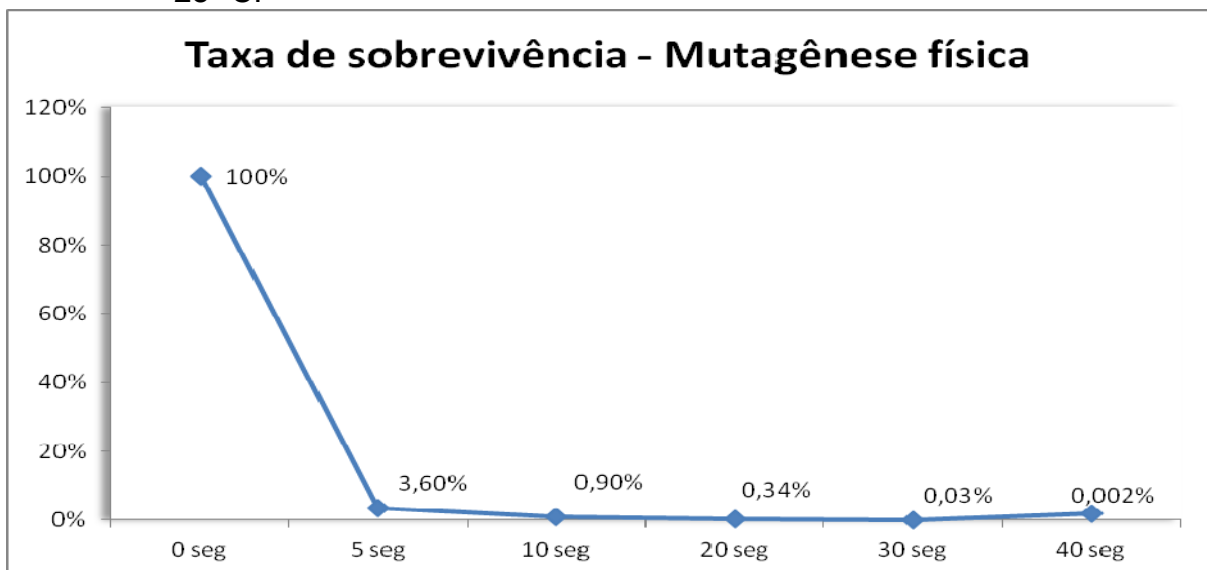
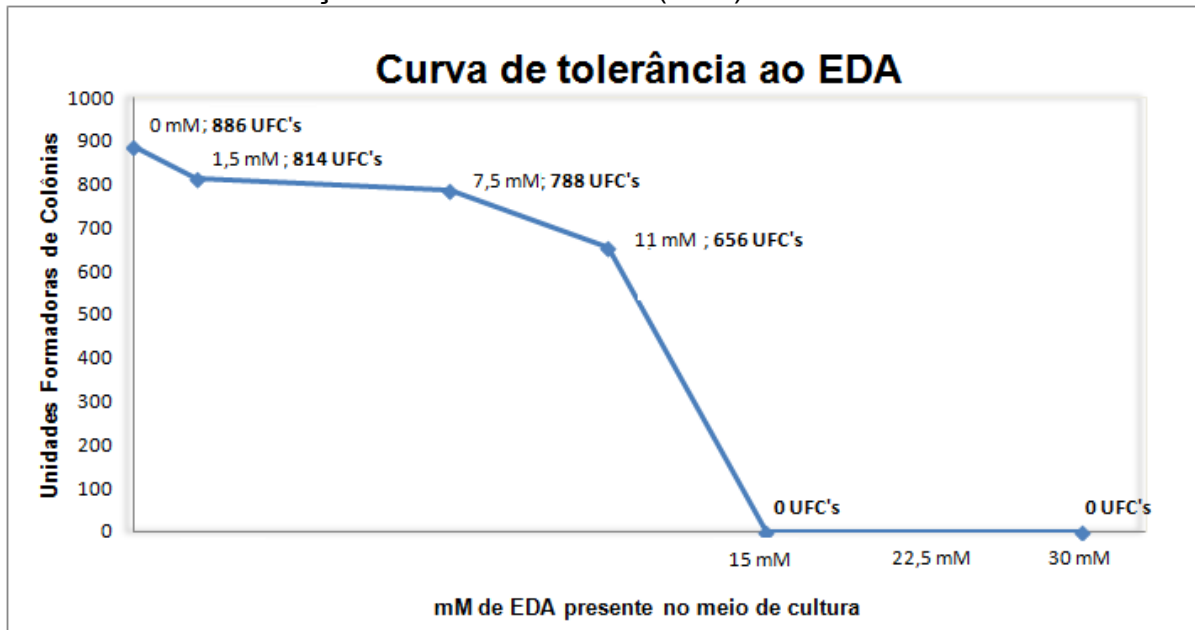


Figura 5 – Taxa de tolerância da estirpe 4.3.1.1 de *Azomonas sp.* após crescimento em meio de cultura JMV sólido a 28 °C por 72 horas com diferentes concentrações de Etilenodiamina (EDA).



Ao final dos experimentos de mutagênese, foram selecionadas quatro mutantes tolerantes ao EDA provenientes do processo de mutagênese química, denominadas B1T5-1, B1T5-2, B1T5-3 e B1T5-4, comprovando a eficiência da utilização do MMS na indução de mutações aleatórias no genoma (FURLAN et al., 2002; ANTONIO, 2012). Não foram obtidos mutantes resistentes a EDA pelo processo de indução de mutagênese aleatória utilizando exclusivamente métodos físicos (exposição à luz U.V. por 5 s), sugerindo que esta metodologia apresenta uma taxa de indução de mutação baixa sobre os genes relacionados ao processo de FBN. Por outro lado, o processo combinado (mutagênese física seguido da mutagênese química) de indução de mutagênese aleatória demonstrou maior eficiência para a obtenção de mutantes de *Azomonas sp.* resistentes ao EDA, resultando na seleção de 12 estirpes denominadas B1T7-1, B1T7-2, B1T7-3, B1T7-4, B1T7-5, B1T7-6, B1T7-7, B1T7-8, B1T7-9, B1T7-10, B1T7-11 e B1T7-12. Esse fato pode ser resultado de um efeito sinérgico da combinação das metodologias aplicadas, potencializando a indução de mutação do DNA resultando em alteração fenotípica (HOUTGRAAF et al., 2006). No total dos experimentos de indução de mutagênese, foram obtidos 16 isolados resistentes ao EDA.

6.2. EXCREÇÃO DE AMÔNIO PELAS ESTIRPES SELECIONADAS

A avaliação quantitativa do amônio presente no cultivo dos isolados selecionados para resistência ao EDA demonstrou variações significativas na quantidade de amônio excretado pelos diferentes isolados (Tabela 1). Os valores obtidos estão discutidos pelos valores normalizados como a relação entre a quantidade do amônio excretado (presente no ELC) pela quantidade de proteínas totais das culturas, apresentados como a relação média entre amônio/proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$) presente em culturas crescidas em meio JMV líquido durante 144 horas, a 28°C e sem agitação.

Os resultados obtidos indicaram que as estirpes selecionadas para resistência ao EDA apresentaram desde uma grande diminuição na quantidade de amônio excretado, como por exemplo, o mutante B1T7-11 com 18,8% da quantidade de amônia excretada pela estirpe selvagem, até grandes aumentos como observado para o mutante B1T7-6, chegando a 217,9% da quantidade excretada pela estirpe selvagem. Mesmo considerando esta grande variação na quantidade de amônio excretado pelas estirpes mutantes, somente três estirpes (B1T5-2, B1T7-2 e B1T7-6) dentre as 16 selecionadas apresentaram diferenças significativas em relação à estirpe selvagem, todas com valores aumentados. Neste sentido, é importante destacar que a metodologia empregada demonstrou-se adequada para a melhoria potencial da capacidade diazotrófica de *Azomonas* sp.

Uma maior excreção de amônio sugere uma maior capacidade de realizar a fixação biológica do nitrogênio, indicando que este processo não parece inibido por elevadas concentrações de amônio nestas estirpes. Estirpes bacterianas com alta capacidade de excreção de amônio tem potencial para suprir parcialmente a necessidade de N em cultura de gramíneas, sendo que uma planta bem nutrida em N tem maior capacidade de crescimento de área foliar e do sistema radicular, pois esse nutriente possui influência direta sobre a divisão e expansão celular, e sobre a fotossíntese (BULL, 1993; VARVEL et al. 1997; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Tabela 1 – Excreção de amônio (NH_4^+) de *Azomonas* sp. selvagem e mutantes resistentes a etilenodiamina.

Estirpe	Metodologia para indução de mutação	$[\text{NH}_4^+]$	[proteínas]	$[\text{NH}_4^+/\text{proteínas}]$
		$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mg}$
4.3.1.1	Selvagem	4,213 a ⁽¹⁾	169,197 ab	24,936 bcd
B1T7-6	Química + física	1,229 bc	22,870 f	54,344 a
B1T5-2	Química	1,083 c	28,426 f	51,463 a
B1T7-2	Química + física	0,933 c	21,944 f	49,998 a
B1T5-3	Química	1,346 bc	35,370 ef	38,596 ab
B1T5-4	Química	1,089 c	35,370 ef	36,978 ab
B1T5-1	Química	1,829 b	77,037 cdef	36,027 ab
B1T7-1	Química + física	1,086 c	37,222 def	35,814 ab
B1T7-7	Química + física	0,979 c	30,741 f	31,697 abc
B1T7-3	Química + física	0,953 c	51,574 def	22,841 bcd
B1T7-10	Química + física	1,049 c	59,907 cdef	18,824 bcd
B1T7-4	Química + física	0,966 c	107,130 bcd	15,484 bcd
B1T7-12	Química + física	0,833 c	59,444 cdef	14,909 bcd
B1T7-8	Química + física	1,009 c	79,352 cdef	14,406 bcd
B1T7-9	Química + física	0,993 c	104,352 bcde	10,615 cd
B1T7-5	Química + física	0,939 c	123,333 bc	7,682 cd
B1T7-11	Química + física	0,969 c	225,648 a	4,687 d
Coefficiente de variação (CV%)		31,13	56,51	53,83

⁽¹⁾ Letras diferentes indicam contraste pelo Teste t a 5 % de probabilidade.

6.3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS PELAS ESTIRPES SELECIONADAS

Os resultados da avaliação quantitativa da produção de compostos indólicos (auxinas) mostrou variações significativas entre as estirpes mutantes selecionadas (Tabela 2). Esta análise está discutida como a relação entre a quantidade de compostos indólicos totais presentes no ELC e a quantidade de proteínas totais das culturas, da mesma forma que a excreção de amônio foi apresentada, exceto que o período de crescimento utilizado para esta análise foi menor (48 horas de crescimento). Assim como observado para a excreção de amônio, a produção de compostos indólicos pelos mutantes selecionados apresentou grande variação em relação à quantidade produzida pela estirpe selvagem 4.3.1.1 de *Azomonas* sp. Foram observados desde a diminuição de até 79,4% na produção de compostos indólicos (mutante B1T7-5), como também incrementos de até 199,3% (mutante B1T7-11), comparativamente à quantidade de auxina-equivalente presente no ELC da estirpe selvagem. Por outro lado, enquanto somente três mutantes apresentaram

capacidade de excreção de amônio maior que a estirpe selvagem, o incremento na produção de compostos indólicos foi identificado em oito dos 16 mutantes selecionados para resistência ao EDA, e uma diminuição significativa na produção de auxina-equivalente ocorreu em seis dos mutantes selecionados. Interessantemente, as estirpes mutantes B1T7-6, B1T5-2 e B1T7-2 tiveram incrementos significativos na quantidade de amônio excretado e também na produção de auxina-equivalente, enquanto a estirpe mutante B1T7-11 exibiu a menor capacidade de excreção de amônio e a maior capacidade de biossíntese de auxina-equivalente. Merzaeva et al. (2010) mostraram que a biossíntese de AIA em meio de cultura líquido é dependente também da aeração e fonte de nitrogênio, assim uma maior disponibilidade de nitrogênio é importante para a obtenção de uma maior produção do ácido 3-indolacético. Entretanto esta relação parece não ter ocorrido para as estirpes B1T7-8, B1T7-9, B1T7-11 e B1T7-12, que apresentaram decréscimo (não significativo) na capacidade de excreção de amônio de 42,3%, 57,4%, 81,2% e 40,2%, respectivamente, sendo que todas estas estirpes mutantes apresentaram maior quantidade de auxina-equivalente no ELC do que a estirpe selvagem. Estudos mais detalhados sobre as modificações genômicas ocorridas nas estirpes mutagenizadas deverão auxiliar na compreensão dos fenótipos observados.

Tabela 2 – Produção de compostos indólicos totais (AIA-equivalente) de *Azomonas* sp. selvagem e mutantes resistentes a etilenodiamina.

Estirpe	Metodologia para indução de mutação	[AIA]	[proteínas]	[AIA/proteínas]
		µg/mL	µg/mL	µg/mg
4.3.1.1	Selvagem	5,636 a ⁽¹⁾	446,019 bc	12,355 e
B1T7-6	Química + física	4,512 bcd	277,037 efg	17,507 cd
B1T5-2	Química	5,737 a	263,611 efg	21,624 ab
B1T7-2	Química + física	4,928 abc	259,213 fg	19,124 bcd
B1T5-3	Química	4,358 bcd	277,731 efg	15,941 de
B1T5-4	Química	5,194 ab	390,926 cd	13,395 e
B1T5-1	Química	3,809 d	462,454 ab	8,421 f
B1T7-1	Química + física	4,305 bcd	517,546 a	8,526 f
B1T7-7	Química + física	1,530 ef	327,037 de	4,748 gh
B1T7-3	Química + física	1,584 ef	274,491 efg	5,838 fgh
B1T7-10	Química + física	5,710 a	271,250 efg	21,381 ab
B1T7-4	Química + física	1,845 e	304,352 ef	6,792 fg
B1T7-12	Química + física	4,898 abc	239,552 fg	20,884 bc
B1T7-8	Química + física	4,070 cd	227,500 g	18,041 bcd
B1T7-9	Química + física	5,061 ab	263,380 efg	19,438 bcd
B1T7-5	Química + física	0,620 f	256,204 fg	2,551 h
B1T7-11	Química + física	5,620 a	230,741 g	24,626 a
Coefficiente de variação (CV%)		20,93	18,52	22,34

⁽¹⁾ Letras diferentes indicam contraste pelo Teste t a 5 % de probabilidade.

O ácido indol acético é considerado um dos principais fitormônios produzidos por bactérias promotoras de crescimento (SIMON; ETRÁSEK, 2011). Algumas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio (*Azospirillum brasilense* Cd, *Azospirillum lipoferum* Br17, *Herbaspirillum seropedicae* Z67, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M4 e *Herbaspirillum* sp.) foram analisadas quanto à capacidade de biossíntese de AIA-equivalente, e o efeito da inoculação destas estirpes em trigo e milho. Em ensaios realizados *in vitro*, as estirpes mostraram correlação positiva entre a quantidade de AIA-equivalente (indóis totais) e a concentração de triptofano adicionado ao meio de cultivo, além de promover alongamento radicular, tanto nas plantas de milho, quanto em trigo (RADWAN, 2004). Também foi observado efeito positivo do fitormônio auxina produzido pela espécie bacteriana *Pseudomonas fluorescens* inoculada em sementes de milho, resultando no aumento do comprimento radicular (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et. al., 2008).

Em geral, as auxinas exógenas provenientes do metabolismo de BPCV têm como função principal a promoção de crescimento de raízes, o que resulta em maior absorção nutricional e contribui diretamente no desenvolvimento vegetal (MARCHIORO, 2005). As auxinas possuem também outras funções fisiológicas, regulando diversos processos de crescimento em órgãos vegetais, como diferenciação de tecido vascular, divisão celular de câmbio vascular e expansão da lâmina foliar. Além disso, auxinas sintéticas tem capacidade de atuar como herbicidas seletivos (DAVIES, 2007).

6.4. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO INOCULADAS

Após o período de sete dias de inoculação, as sementes do híbrido de milho P30F53H (DuPont) inoculadas com as 16 estirpes mutantes (10^6 cel/ semente), bem como os tratamentos controle (inoculação com a estirpe selvagem e sementes sem inoculação), foram analisados os seguintes parâmetros de crescimento das plântulas: peso de matéria fresca de parte aérea e de raiz, peso de matéria seca de parte aérea e de raiz, diâmetro de raízes, área do sistema radicular, volume do sistema radicular e comprimento de raízes. Todos os valores foram mensurados avaliando-se as médias de 48 sementes inoculadas em cada tratamento. Não houve influência significativa da inoculação das estirpes mutantes e selvagem de *Azomonas* sp. 4.3.1.1. sobre a germinação das sementes de milho.

Tabela 3 – Número de sementes germinadas de acordo com estirpe inoculada

Estirpe	Planta (g)
Controle	12,00 ^a ⁽¹⁾
4.3.1.1	9,50 ^a
B1T7-6	10,50 ^a
B1T5-2	11,25 ^a
B1T7-2	11,50 ^a
B1T5-3	11,75 ^a
B1T5-4	12,00 ^a
B1T5-1	11,25 ^a
B1T7-1	10,50 ^a
B1T7-7	11,00 ^a
B1T7-3	10,50 ^a
B1T7-10	10,25 ^a
B1T7-4	10,50 ^a
B1T7-12	11,00 ^a
B1T7-8	10,50 ^a
B1T7-9	11,75 ^a
B1T7-5	11,25 ^a
B1T7-11	10,50 ^a
Coefficiente de variação (CV%)	3,96

⁽¹⁾ Letras diferentes indicam contraste pelo Teste t a 5 % de probabilidade.

6.4.1 Peso de Matéria Fresca

As determinações gravimétricas da matéria fresca das plântulas de milho sob os diferentes tratamentos de inoculação (controle não inoculado, inoculação com a estirpe selvagem 4.3.1.1 de *Azomonas* sp. e respectivos mutantes resistentes ao EDA) não indicaram diferenças significativas no peso fresco total (peso das plantas), conforme a Tabela 3. Entretanto os resultados indicaram que a partição da matéria fresca entre raízes e a parte aérea das plântulas foi influenciada pela inoculação de alguns dos mutantes avaliados. Esta influência é melhor observada nos valores da relação entre a matéria fresca da raiz, onde as plântulas de milho inoculadas com as estirpes mutantes B1T7-8, B1T7-6, B1T7-7 e B1T7-1 apresentaram valores superiores aos observados para as plantas não inoculadas (Controle) e aos observados para as plantas inoculadas com a estirpe selvagem (4.3.1.1), enquanto a inoculação das sementes de milho com a estirpe B1T5-2 resultou em plântulas com menores valores para este mesmo parâmetro, comparativamente às plantas não

inoculadas. Apesar da relação raiz:parte aérea indicar se houve direcionamento do metabolismo para o desenvolvimento de algum destes tecidos, a análise do peso fresco de raízes indicou somente que somente a estirpe B1T7-8 apresentou valor significativamente superior aos tratamentos controle (não inoculado e inoculado com a estirpe selvagem), enquanto as plantas inoculadas com a estirpe B1T5-3 tiveram menor peso fresco de raízes que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem. Da mesma forma, a avaliação da matéria fresca da parte aérea indicou que as estirpes mutantes B1T5-2 e B1T712 levaram a maiores valores que os observados para as plantas não inoculadas, enquanto a inoculação com os mutantes B1T7-7, B1T7-1, B1T7-6 e B1T7-8 levou a diminuição da matéria fresca da parte aérea comparativamente às plantas inoculadas com a estirpe selvagem, sendo que as duas últimas diferiram também das plantas não inoculadas (Tabela 3).

Tabela 4 – Peso médio da matéria fresca e relação gravimétrica entre o peso médio de aízes e o peso médio da parte aérea de plântulas de milho inoculadas com estirpes da bactéria *Azomonas* sp. selvagem e mutantes resistentes a etilenodiamina, após sete dias de incubação em câmara de germinação.

Estirpe	Planta (g)	Raízes (R) (g)	Parte aérea (PA) (g)	R/PA
Controle	1,163 NS	0,693 bcde	0,469 cdef	1,478 efgh
4.3.1.1	1,203 NS	0,708 bcd	0,494 abcd	1,436 fg
B1T7-6	1,130 NS	0,724 abc	0,406 gh	1,789 ab
B1T5-2	1,220 NS	0,689 cde	0,531 ab	1,308 i
B1T7-2	1,149 NS	0,697 bcde	0,452 cdefgh	1,547 cdefg
B1T5-3	1,115 NS	0,645 e	0,470 cdef	1,372 hi
B1T5-4	1,121 NS	0,681 cde	0,440 defgh	1,552 cdefg
B1T5-1	1,141 NS	0,657 de	0,484 bcde	1,365 hi
B1T7-1	1,143 NS	0,706 bcd	0,437 efgh	1,638 bcd
B1T7-7	1,127 NS	0,702 bcde	0,425 fgh	1,665 bc
B1T7-3	1,222 NS	0,721 abc	0,501 abc	1,442 fg
B1T7-10	1,155 NS	0,715 abc	0,440 defgh	1,625 cde
B1T7-4	1,162 NS	0,706 cde	0,456 cdefg	1,549 cdefg
B1T7-12	1,293 NS	0,747 ab	0,546 a	1,379 hi
B1T7-8	1,164 NS	0,767 a	0,397 h	1,941 a
B1T7-9	1,174 NS	0,720 abc	0,454 cdefg	1,588 cdef
B1T7-5	1,128 NS	0,674 cde	0,454 cdefgh	1,489 defgh
B1T7-11	1,221 NS	0,716 abc	0,505 abc	1,424 ghi
Coefficiente de variação (CV%)	6,10	5,78	8,64	7,23

⁽¹⁾ Letras diferentes indicam contraste pelo Teste t a 5 % de probabilidade.

As diferenças no peso da matéria fresca de raízes e da parte aérea das plantas de milho sob os diferentes tratamentos de inoculação não podem ser explicadas com base na capacidade de excreção de amônio ou de produção de auxina-equivalente pelas estirpes testadas. Não foi observada correlação significativa (dados não apresentados) entre estes parâmetros, entretanto as análises baseadas no peso fresco podem mascarar efeitos dos tratamentos testados, uma vez que podem ter ocorrido variações no conteúdo de água das plântulas decorrente de fatores experimentais não controlados.

6.4.2 Peso de Matéria Seca

Não foram observadas diferenças significativas no peso seco total das plântulas de milho em resposta à inoculação com a bactéria *Azomonas* sp. 4.3.1.1 e respectivos mutantes resistentes ao EDA (Tabela 4), e não houve correlação aparente entre os parâmetros de desenvolvimento inicial do milho e a capacidade de excreção de amônio ou produção de auxina pelas estirpes mutantes. Entretanto, houveram diferenças com relação à partição da matéria seca, entre raízes e a parte aérea dos diferentes tratamentos. Os mutantes B1T7-8, B1T7-6, B1T7-7, B1T7-1, B1T7-10 e B1T7-4 levaram a modificações na partição do carbono que privilegiaram o desenvolvimento do sistema radicular em maior intensidade do que observado para as plantas não inoculadas e plantas inoculadas com a estirpe selvagem 4.3.1.1 de *Azomonas* sp, como observado para a relação entre o peso seco de raízes e o peso seco da parte aérea. Este efeito ocorreu principalmente pela diminuição da quantidade de carbono destinado ao desenvolvimento da parte aérea, uma vez que as plantas inoculadas com os mutantes B1T7-10, B1T7-9, B1T7-1, B1T7-2, B1T7-7, B1T7-6, B1T5-4 e B1T7-8 levaram a menor quantidade de matéria seca nestes tecidos do que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem 4.3.1.1. Os efeitos sobre o desenvolvimento do sistema radicular não foram em sua maioria significativos, exceto para o mutante B1T7-8, que levou a maior quantidade de matéria seca de raízes em comparação às plantas controle.

BORTOLINI et. al. (2002) diz que a matéria seca é um parâmetro excelente na indicação de intensidade de crescimento de plantas. Estudos anteriores mostraram que bactérias com capacidade de produção de AIA extracelular favorecem ao acúmulo de matéria seca em plantas, pois contribuem na produção de

biomassa, além da indução de crescimento radicular e crescimento de pêlos radiculares (MOLLA et al., 2001; GARCÍA et al., 2010).

Tabela 5 – Peso médio da matéria seca e relação gravimétrica entre o peso médio de raízes e o peso médio da parte aérea de plântulas de milho inoculadas com estirpes da bactéria *Azomonas* sp. selvagem e mutantes resistentes a etilenodiamina, após sete dias de incubação em câmara de germinação.

Estirpe	Planta (mg)	Raízes (R) (mg)	Parte aérea (PA) (mg)	R/PA
Controle	96,675 NS	57,583 cde	39,092 abcd	1,474 ghi
4.3.1.1	100,294 NS	58,276 bcde	42,017 a	1,387 hij
B1T7-6	100,136 NS	64,439 ab	35,698 cde	1,808 b
B1T5-2	98,595 NS	58,477 bcde	40,119 abc	1,473 ghi
B1T7-2	94,102 NS	57,936 cde	36,167 cde	1,604 cdefg
B1T5-3	92,521 NS	55,028 de	37,492 abcde	1,466 ghi
B1T5-4	92,417 NS	57,583 cde	34,833 de	1,659 bcdef
B1T5-1	102,667 NS	60,763 bcd	41,905 ab	1,450 ghi
B1T7-1	97,709 NS	61,487 abcd	36,222 cde	1,725 bcd
B1T7-7	98,994 NS	63,088 abc	35,906 cde	1,760 bc
B1T7-3	98,714 NS	59,155 bcd	39,559 abc	1,496 fgghi
B1T7-10	100,914 NS	63,478 abc	37,436 bcde	1,697 bcde
B1T7-4	98,070 NS	59,379 bcd	38,691 abcd	1,539 efgh
B1T7-12	91,793 NS	52,684 ef	39,109 abcd	1,355 ij
B1T7-8	101,673 NS	67,861 a	33,812 e	2,018 a
B1T7-9	94,769 NS	58,288 bcde	36,481 cde	1,604 cdefg
B1T7-5	96,078 NS	58,589 bcde	37,488 abcde	1,566 defgh
B1T7-11	88,026 NS	48,264 f	39,761 abc	1,220 j
Coefficiente de variação (CV%)	7,02	7,71	8,45	8,06

⁽¹⁾ Letras diferentes indicam contraste pelo Teste t a 5 % de probabilidade.

6.4.3 Arquitetura do Sistema Radicular

As imagens digitalizadas das raízes foram avaliadas pelo programa Giaroots de acordo com os seguintes parâmetros: Diâmetro médio de raiz, área superficial de raiz, volume de raiz e comprimento de raiz.

Em relação ao diâmetro médio de raiz, a estirpe selvagem diferiu das demais estirpes testadas, alcançando um diâmetro médio de 0,470 mm. As estirpes mutantes B1T7-1, B1T5-1, B1T5-3, B1T5-2, B1T5-4, B1T7-2, B1T7-3 e B1T7-4 apresentaram diâmetro médio de raízes superior às plantas não inoculadas, enquanto as estirpes B1T7-9, B1T7-11 e B1T712 apresentaram raízes mais finas

que a planta não inoculada. O diâmetro das raízes está relacionado com a capacidade de penetração em solos mais compactados, porém em solos agrícolas com cultura de milho, por exemplo, raízes mais finas podem ser importantes também por reduzir o custo metabólico de construção e manutenção radicular (EISSENSTAT, 1992; LYNCH, 2011).

Em relação à área superficial de raiz, os tratamentos B1T5-1, B1T5-2, B1T5-3, B1T7-5, B1T7-1, B1T7-6, B1T7-7, B1T7-8, B1T7-9 e B1T7-10 e a estirpe selvagem 4.3.1.1 tiveram valores estatisticamente iguais entre si e superiores ao tratamento com plantas não inoculadas (TABELA 5).

Na análise de volume, a estirpe selvagem 4.3.1.1 apresentou valores similares entre si com as estirpes mutantes B1T5-1, B1T5-2, B1T5-3, B1T7-6, B1T7-8 e B1T7-9 e superiores ao tratamento com plantas não inoculadas (TABELA 5).

Quando analisado o comprimento de raiz, a estirpe B1T5- se mostrou superior em relação à capacidade de promoção de crescimento quando relacionada à estirpe selvagem. A estirpe selvagem 4.3.1.1., por sua vez, apresentou similaridade estatística com as estirpes B1T5-1, B1T5-2, B1T5-3, B1T7-1, B1T7-2, B1T7-3, B1T7-4, B1T7-5, B1T7-6, B1T7-7 E B1T7-8, sendo superiores ao tratamento com plantas não inoculadas (TABELA 5).

Tabela 6 – Diâmetro médio de raízes, área superficial média de raízes, volume do sistema radicular e comprimento total de raízes de plântulas de milho inoculadas com estirpes da bactéria *Azomonas* sp. selvagem e mutantes resistentes a etilenodiamina, após sete dias de incubação em câmara de germinação. Dados obtidos com a utilização do programa Giaroots.

Estirpe	Diâmetro (mm)	Área (cm ²)	Volume (cm ³)	Comprimento (cm)
Controle	0,420 fg	68,144 fg	1,033 g	23,288 i
4.3.1.1	0,470 a	80,671 abc	1,341 a	25,878 bcd
B1T7-6	0,417 fg	82,901 ab	1,251 abcd	26,102 abcd
B1T5-2	0,453 cd	79,516 abc	1,282 abc	26,391 ab
B1T7-2	0,448 d	73,240 def	1,174 de	26,551 ab
B1T5-3	0,459 bc	78,613 bcd	1,285 abc	26,294 abc
B1T5-4	0,449 cd	72,285 ef	1,162 de	26,789 a
B1T5-1	0,461 b	80,325 abc	1,318 ab	26,499 ab
B1T7-1	0,461 b	74,801 cde	1,227 bcde	25,968 abcd
B1T7-7	0,413 gh	82,443 ab	1,229 bcde	26,057 abcd
B1T7-3	0,440 e	72,635 def	1,147 ef	25,515 cde
B1T7-10	0,417 fg	77,000 bcde	1,163 de	24,613 fg
B1T7-4	0,438 e	65,866 g	1,039 g	25,329 def
B1T7-12	0,390 j	72,288 ef	1,025 g	23,483 hi
B1T7-8	0,422 f	82,932 ab	1,259 abcd	25,348 def
B1T7-9	0,407 hi	84,991 a	1,254 abcd	24,904 efg
B1T7-5	0,423 f	79,722 abc	1,2014 cde	26,702 ab
B1T7-11	0,404 i	71,504 efg	1,050 fg	24,281 gh
Coefficiente de variação (CV%)	1,23	5,62	5,87	2,34

⁽¹⁾ Letras diferentes indicam contraste pelo Teste t a 5 % de probabilidade.

O uso de bioestimulantes pode trazer efeitos positivos sobre o comprimento de raiz, obtendo influência significativa sobre o comprimento radicular (CASTRO et al., 2003). O maior comprimento das raízes traz vantagem significativa para as plantas na absorção de nutrientes do solo, fator importante na concorrência com plantas daninhas e no estabelecimento da cultura em meio a estresses ambientais (MOGHADDAM et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2010).

O teor de auxinas é indicado como um dos fatores principais na promoção de crescimento vegetal, tanto pela indução de maior comprimento de raízes como pela formação de novas raízes e pêlos radiculares (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Neste experimento foi mostrado que a estirpe B1T7-6, que se destacou no comprimento de raiz e matéria seca de raiz teve produção de compostos indólicos

100% superior à estirpe selvagem, além de ter a maior taxa de excreção de amônio, 86 % superior à selvagem.

Ensaio futuros com a estirpe B1T7-6 serão de extrema importância para análise de seus efeitos na indução de crescimento vegetal. Ensaio em campo serão necessários para comprovação de seus efeitos sobre o desenvolvimento de gramíneas, avaliando sua competitividade com estirpes presentes no solo e resistência a fatores que causam efeitos na promoção de crescimento vegetal, como salinidade, temperatura, umidade e pH do solo (RUMJANEK et al., 2005).

7. CONCLUSÃO

- O processo de mutagênese química e o processo de mutagênese física seguida de mutagênese química se mostraram eficientes na seleção de mutantes fixadores de nitrogênio resistentes ao composto Etilenodiamina.
- O uso de EDA possibilitou a seleção de isolados com possível alteração no metabolismo de N, observado pela variação na excreção de amônio entre os isolados selecionados.
- A produção de compostos indólicos foi superior em relação à estirpe selvagem em oito mutantes das 16 analisadas.
- A taxa de excreção de amônio foi superior em relação à estirpe selvagem em três mutantes das 16 analisadas.
- As estirpes B1T5-2, B1T7-2, B1T7-6 tiveram incrementos significativos tanto na produção de compostos indólicos, quanto na quantidade de amônio excretado.
- Em relação ao desenvolvimento inicial de plantas, a estirpe B1T5-4 se mostrou superior a selvagem no comprimento radicular e a estirpe B1T7-8 demonstrou maior valor de matéria seca de raiz.
- O mutante B1T7-6 reuniu a maior quantidade de características desejáveis (AIA, FBN, Matéria seca de raiz e comprimento de raiz). Os índices de excreção de NH_4^+ e produção de AIA foram 86% e 100% superiores em relação à estirpe selvagem, respectivamente. A Matéria seca de raiz e comprimento de raiz foram 12% superiores a estirpe controle (sem inoculação).

REFERÊNCIAS

- ANTONIO, T. **Obtenção de mutantes de *Streptomyces clavuligerus* e avaliação de condições de cultivo para a melhoria de produção de cefamicina**. 2012. 62 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Araraquara. SP.
- ARAÚJO, J. L. S., BALDANI, V. L. D. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**, 2007. 74 p. (Documentos/ Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498, 234).
- BHATTACHARJEE, R.B; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for nonlegumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p.199-209, 2008.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da Inoculação de *Herbaspirillum* spp. No processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 238 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Itaguaí. RJ.
- BANO, Q.; ILYAS, N.; BANO, A.; ZAFAR, N.; AKRAM, A.; HASSAN, F. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, p. 13-20, 2013.

BAUTISTA, L. X. C.; GALLARDO, I. R. **Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) em cultivos microbianos**. 2008. 140 f. Trabalho de conclusão de curso – Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, 2008.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n.4, p.1327–1350, 2012.

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

BORTOLINI, C. G.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G.; FORSTHOFER, E. L. Sistemas de aplicação de nitrogênio e seus efeitos sobre o acúmulo de N na planta de milho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.26, p.373-380, 2002.

BOYD, E. S.; PETERS, J. W. New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. August, p. 201, jan. 2013.

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254, 1976.

BRAGA, B.; BARROS, M. T. L.; CONEJO, J. G. L.; EIGER, S.; HESPANHOL, I.; JULIANO, N.; NUCCI, N.; PORTO, M.; SPENCER, M. **Introdução à Engenharia Ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2006. 318 p.

BRASIL, Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRASIL. (2005). Decreto nº 11.105 do Ministério da Saúde, de 24 de março de 2005. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília, DF: Congresso Nacional.

BRAY, C.M.; WEST, C.E. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytologist*. v.168, n.3, p.511-528, 2005.

BRITT, A.B. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. **Trends in Plant Science**. v.4, n.1, p.20-25, 1999.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **Am Soc. Plant. Physiology**. 1280 p.,2000.

BUI, L. A.; DUPREB, C.; LEGRAND, J.; GRIZEAU, D. Isolation, improvement and characterization of an ammonium excreting mutant strain of the heterocytous cyanobacterium, *Anabaena variabilis* PCC 7937. **Biochemical Engineering Journal**. V. 90, p. 279-285, 2014.

BULGARELLI D, SCHLAEPPI K, SPAEPEN S, VER LOREN VAN THEMAAT E, SCHULZE-LEFERT P: Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annu Rev Plant Biol** 2013, 64:807-838.

BULL, L. T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L.T.; CANTARELLA, H. (ed.). **Cultura do milho**: Fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 63-146.

CANNON, F. C.; DIXON, R.A. POSTGATE, J.R. Derivation and properties of F-prime factors carryng nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 93, p. 111-125, 1976.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: simpósio sobre nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira, 2007, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: IPNI, 2007. P. 355-392.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em

experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. Revista Brasileira de Agrocomputação, V.1, N.2, p.18-24. 2001.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. Microbiologia do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA. M. A. A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. In: SILVEIRA, A.P.D., FREITAS, S.D.S. Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-Leguminosas. In: **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. 1.ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. p.79-96.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. Biorreguladores e bioestimulantes na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Ed.). **Milho: estratégias para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, 2003. p. 99-115.

CASTRO-RODRÍGUEZ, V. et al. The glutamine synthetase gene family in *Populus*. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 119, p. 1–16, 2011.

CHEN, W.X.; WANG, E.T.; LI, Y.B.; LI, Y.; GAO, J.L Rhizobium bainanensis, a new species of root nodule bacteria isolated from tropical region. In: International Symposium on Diversity and Taxonomy of Rhizobia, Wuhan, China, p.16, 1994.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, May 2010.

COMPANT S, MITTER B, COLLI-MULL JG, GANGL H, ET AL. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microb. Ecol.** 62: 188-197.

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

CONTADO, J. L. Produção e caracterização da β -frutofuranoisidade de Linhagem mutante de *Aspergillus niger* e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 1998.

COSTA, KARITA REIS. **Metodologia para isolamento de bactérias promotoras do crescimento associadas à plantas de milho: uma abordagem direcionada à obtenção de isolados especializados**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

COUILLEROT, O. et al. Comparison of prominent Azospirillum strains in Azospirillum-Pseudomonas-Glomus consortia for promotion of maize growth. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4639–49, maio 2013.

CHRISTIANSEN-WENIGER C, VAN VEEN JA (1991) NH_4^+ -excreting Azospirillum brasilense enhance the nitrogen supply of a wheat host. *Appl Environ Microbiol* 57:3006–3012.

DAVIDSSON P.R., KARIOLA T., NIEMI O., PALVA E.T. (2013) Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. **Frontiers in Plant Science** 4:191. DOI:10.3389/fpls.2013.00191.

DAVIES, P. J. Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action. Dordrecht: Kluwer, 2007.

DIXON, R., and KAHN, D. **Genetic regulation of biological nitrogen fixation**. *Nat Rev Microbiol* 2: p. 621-631, 2004.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. *In*: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (eds.). **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992.

DOMMELEN, A. V.; KEIJERS, V.; WOLLEBRANTS, A.; VANDERLEYDEN, J. Phenotypic Changes Resulting from Distinct Point Mutations in the *Azospirillum brasilense glnA* Gene, Encoding Glutamine Synthetase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n°9, p.5699-5701. 2003.

ECKENFELDER, W.W. (1989) *Industrial water pollution control*. 2ª edição, McGraw-Hill, Singapura.

EISENHAUR, N. Aboveground-belowground interactions as a source of complementarity effects in biodiversity experiments. **Plant and Soil**, Netherlands, v.351, n.1-2, p.1-22, fev. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11104-011-1027-0/fulltext.html>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

EISSENSTAT D. M. 1992. Costs and benefits of constructing roots of small diameter. *Journal of Plant Nutrition* 15: 763–782.

ELEFSINIOTIS, P., WAREHAM, D.G. E SMITH, M.O. (2004) Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. *Journal of Biotechnology*, **114**: 289–297.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. Londrina: Editora Planta, 403p, 2006.

FAGERIA, N.K.; SLATON, N.A.; BALIGAR, V.C. Nutrient management for improving lowland rice productivity and sustainability. **Advances in Agronomy**. v. 80, p. 63-152, 2003.

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

FAROOQ, M. et al. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Management Science**, n/a. doi: 10.1002/ps.2091, 2011.

FU Z.Q. AND DONG X. (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. **Annual Review of Plant Biology** 64:839-863. DOI:10.1146/annurev-arplant-042811-105606.

FURLAN, R. L. A.; GARRIDO, L. M.; BRUNATTI, G.; PADILLA, G. A rapid and sensitive methods for screening of DNA intercalating antibiotics. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, n. 21, p. 1807-1815, 2002.

GACHOMO, E. W.; SHONUKAN, O. O.; KOTCHONI, S. O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 26-32, 2003.

GALKOVSKYI et al.: GiA Roots: software for the high throughput analysis of plant root system architecture. *BMC Plant Biology* 2012 12:116.

GARCÍA F., MUÑOZ H., CARREÑO C., MENDOZA G. (2010). Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agro - pecuaria* 1: 107-116.

GILBERT JA, MEYER F, JANSSON J, GORDON J, PACE N, TIEDJE J, LEY R, FIERER N, FIELD D, KYRPIDES N, GLOCKNER FO, KLENK HP, WOMMACK KE, GLASS E, DOCHERTY K, GALLERY R, STEVENS R, KNIGHT R: **The Earth Microbiome** Project: meeting report of the “1st EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6 2010. *Stand Genomic Sci* 2010, 3:249-253.

GOPALAKRISHNAN, S. et al. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech, Berlin*, v. 5, n. 4, p. 355-377, 2014.

GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J.C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:328-338, 2009.

- GREENE, E.A.; CODOMO, C.A.; TAYLOR, N.E.; HENIKOFF, J.G.; TILL, B.J.; REYNOLDS, S.H.; ENNS, L.C.; BURTNER, C.; JOHNSON, J.E.; ODDEN, A.R.; COMAI, L.; HENIKOFF, S. Spectrum of chemically induced mutations from a largescale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. **Genetics**. v.164, p.731-740, 2003.
- HALBLEIB, C.M.; LUDDEN, P.W. Regulation of biological nitrogen fixation. *Journal of nutrition*. Pennsylvania, v. 130, p. 1081-1084, 2000.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914. 1997.
- HARPER, C. J. et al. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 138, p. 1–12, 2010.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.
- HAYWARD, D.; HELDEN, P. D. VAN; WIID, I. J. F. Glutamine synthetase sequence evolution in the mycobacteria and their use as molecular markers for *Actinobacteria* speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 48, p. 1–13, 2009.
- HEIDRICH K., BLANVILLAIN-BAUFUMÉ S., PARKER J.E. (2012). Molecular and spatial constraints on NB-LRR receptor signaling. **Current Opinion in Plant Biology** 15(4):385-391. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.03.015.
- HERNANDEZ-RODRIGUEZ, A.; HEYDRICH-PEREZ, M.; ACEBO-UERRERO, Y.; VELAZQUEZ-DEL, M. G.; HERNANDEZ-LAUZARDO, N. A. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 180-186, 2008.

HOUTGRAAF, J.H.; VERSMISSENA, J.; GIESSEN, W.J.D. **A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells.** *Cardiovascular Revascularization Medicine*, v. 7, p. 165-172, 2006.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular técnica, 13).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja:** componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p.

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

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

IKEHATA, H.; ONO, T. The mechanisms of UV mutagenesis. **Journal of Radiation Research**, v. 52, n. 2, p. 115-125, 2011.

ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.

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

JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 1-3, 9 jun. 2012.

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

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

JANSSEN, D. B. et al. Characterization of Glutamine-Requiring Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 151, n. 3, p. 1176–1183, 1982.

KELLER, B.; ZOLZER, F.; KIEFER, J. Mutation induction in haploid yeast after split-dose radiation exposure. II. Combination of UV-irradiation and X-rays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 43, p. 28-35, 2004.

KIM, J.H.; BAEK, M-H.; CHUNG, B.Y.; WI, S.G.; KIM, J-S. Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *Journal of Plant Biology*. v.47, p.314–321, 2004.

KUMAR D., SHIVAY Y. S., DHAR S., KUMAR C., PRASAD R., 2012, Rhizospheric Flora and the Influence of Agronomic Practices on Them: A Review. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*

LAKSHMANAN V., SELVARAJ G., BAIS H. 2014. Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. *Plant Physiology* **166**: 689–700.

LEHMANN, T.; HOFFMANN, M.; HENTRICH, M.; POLLMANN, S. “Indole-3-acetamide- dependent Auxin Biosynthesis: a Widely Distributed Way of Indole-3-acetic Acid Production?” *European Journal of Cell Biology*, 89 (12): 895-905. 2010.

LEME AC, BEVILAQUA MR, RHODEN SA, MANGOLIN CA, ET AL. (2013). Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on

esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2) analyses. **Genet. Mol. Res.** 12: 4095-4105.

LIN, L.; XU, X. "Indole-3-Acetic Acid Production by Endophytic *Streptomyces* sp. En-1 Isolated from Medicinal Plants." *Current Microbiology*, 67 (2): 209–217. 2013.

LIU W., LIU J., NING Y, DING B., WANG X., WANG Z., WANG G-L. (2013). Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant* 6(3):605-620. DOI: 10.1093/mp/sst015.

LODEWYCKX, C., VANGRONSVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E. R. B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M., VAN DER LELIE, D. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21 (6): 583-606.

LUHE, A. L.; TING, E. N. Y.; TAN, L.; WU, J.; ZHAO, H. Engineering of small sized DNAs by error-prone multiply-primed rolling circle amplification for introduction of random point mutations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010 doi:10.1016/j.molcatb.2010.07.011.

LYNCH J. P. 2011. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology* 156: 1041–1049.

MACHADO, H. B. **Isolamento e caracterização de mutantes de *Azospirillum brasilense* constitutivos para fixação de nitrogênio.** 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1988.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Micorbiology**, v. 37, p. 549-553, 1991.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10a edição, São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARCHIORO, L. E. T. (2005) Produção de Ácido Indol Acético e Derivados por Bactérias Fixadoras de Nitrogênio. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Curitiba – PR, Universidade Federal do Paraná – UFPR, 74 p.

MARSUDI, N. D. S.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p. 1229-1238, 1999.

MEDINA, V. G., ALMERING, M.J., VAN MARIS, A.J., PRONK, J.T. Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strains engineered to use acetic acid as an electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 190-195, (2010).

MERZAEVA, O. V.; SHIROKIKH, I. G. "The Production of Auxins by the Endophytic Bacteria of Winter Rye." *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46 (1): 44–50. 2010.

MIMMO T., HANN S., JAITZ L., CESCO S., GESSA C. E., PUSCHENREITER M., 2011, Time and substrate dependent exudation of carboxylates by *Lupinus albus* L. and *Brassica napus* L. *Plant physiology and Biochemistry*, 49; 1272-1278.

MOBINI-DEHKORD, M. NAHVI, I., ZARKESH-ESFAHANI, H., GHAEDI K., TAVASSOLI, M., AKADA, R. Isolation of a novel mutant strains of *saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate-induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(4), 403-8, 2008.

MOLLA A. H., SHAMSUDDIN Z. H., SAUD H. M. (2001). Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. *Communications in Soil Science Plant Analysis* 32: 2177-2187.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: (Ed.). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. P. 285-359.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Ufla, 2006. 729p.

MOGHADDAM, M. J. M.; EMTIAZI, G.; SALEHI, Z. Enhanced Auxin Production by *Azospirillum* Pure Cultures from Plant Root Exudates. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, p. 985–994, 2012.

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

PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., eds. 1982. *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy, Inc., Madison.

PIGATTO, G. Irradiação UV em *Xanthomonas campestris pv. campestris* visando a produção da goma xantana. *Disertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista*. 2008.

PRASHAR P., KAPOOR N., SACHDEVA S., 2014, Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance (Review), *Rev Environ Sci Biotechnol*, 13: 63-77.

PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Netherlands*, v.64, p.185-210, 2001.

PRICE, J.; LAXMI, A.; MARTIN, S.K.; JANG, J.C. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2128-2150, 2004.

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

RADWAN, T. E. E., MOHANMED, Z. K., REIS, V. M. (2005) Aeração e Adição de Sais na Produção de Ácido Indol Acético por Bactérias Diazotróficas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40:997-1004.

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

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

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: GALAPE, F.; ROCHA, S. **Biotecnologia: estado de arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 247.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. SBCS, Viçosa, 2006. 154-194p.

REIS, V. M. ; SANTOS, P. E. L.; SALGADO, S.T.; VOGEL, J.; STOFFLES, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; MELLADO, J. C. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogenfixing, plant-associated bacterium. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Oxford, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REMANS R., RAMAEKERS L., SCHELKENS S., HERNANDEZ G., GARCIA A., REYES J. L., MENDEZ N., TOSCANO V., MULLING M., GALVEZ L.

VANDERLEYDEN J. (2008). Effect of *Rhizobium-Azospirillum* co-inoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312:25-37

RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 302, n. 1-2, p. 249–261, 5 dez. 2007.

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

ROGOZIN, I.B.; BERIKOV, V.B.; VASUNINA, E.A.; SINITSINA, O.I. The effect of the primary structure of DNA on induction of mutations by alkylating agents. **Russian Journal of Genetics**. v.37, n.6, p.704-710, 2001.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 281-335, abr. 2005.

SAHARAN B. S., NEHRA V., 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review, *Life Sciences and Medicine Research*.

SAIKIA, S. P. et al. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 6, p. 1085–1102, 2012.

SANT'ANNA, F. H. et al. Tools for genetic manipulation of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 107, jan. 2011.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v.111, p.743–767,2013. DOI: 10.1093/aob/mct048.

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

SETTEN L, SOTO G, MOZZICAFREDDO M, FOX AR, LISI C, ET AL. (2013) **Engineering Pseudomonas protegens Pf-5 for Nitrogen Fixation and its Application to Improve Plant Growth under Nitrogen-Deficient Conditions.** PLoS ONE 8(5): e63666. doi:10.1371/journal.pone.0063666.

SHI, D.J.; WANG, C.L.; WANG, K.M. (2009). Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36(1): 139-147.

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

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

SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J., REMANS, R. (2007) Indole-3-Acetic Acid in Microbial and Microorganism-Plant Signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, n. 4, 31:425–448.

SPOEL S. H., DONG X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nat. Rev. Immunol.** 12 89–100 10.1038/nri3141.

SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, A. K. Adenosine Diphosphate Ribosylation of Dinitrogenase Reductase and Adenylation of Glutamine Synthetase Control Ammonia Excretion in Ethylenediamine-Resistant Mutants of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Current Microbiology**, v.53, p.317-323. 2006.

STANLEY, D.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; ROGERS, P.; STANLEY, G.A. (2010). Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 37: 139-149.

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

STASKAWICZ, B. J.; MUDGETT, M. B.; DANGL, J. L.; GALAN, J. E. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. **Science**, v. 292, n. 5525, p. 285-2289, Jun 2001.

STEFANIS C., ALEXOPOULOS A., VOIDAROU C., VAVIAS S., BEZIRTZOGLU E., 2013, Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities, *Folia Microbiol*, 58: 61-68.

SUMMER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**. v. 12, p. 54-123, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5. ed. [s.l.] Sinauer Associates, 2010.

TANG M, PELKEY KA, NG D, IVAKINE E, MCBAIN CJ, ET AL. (2011) Neto1 Is an Auxiliary Subunit of Native Synaptic Kainate Receptors. *J Neurosci* 31: 10009–10018. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6617-10.2011. pmid:21734292.

TAPIA, E. V., **Melhoramento genético da levedura oleaginosa *Lipomyces tarkeyi* por mutagênese aleatória, visando a produção de biocombustíveis de segunda geração**. 2012. 88 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP.

TSAVKELOVA, E.; OESER, B.; YOUNG, L. O.; ISRAELI, M.; SASSON, Y.; TUDZYNSKI, B.; SHARON, A. "Identification and Functional Characterization of Indole-3-acetamide-mediated IAA Biosynthesis in Plant-associated *Fusarium* Species." *Fungal Genetics and Biology*, 49 (1): 48–57. 2012.

TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J.; ANDO, A. Progressos na indução e uso de mutações *in vitro*. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI, p.459-506, 1998.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA) (2009) - Nutrient control design Manual – State of technology review report. EPA/600/R-08/012.

VAN HARTEN, A.M. Mutation breeding: theory and practical applications. London: Cambridge University Press. 207p., 1998.

VARVEL, G. E.; SCHPERS, J.S.; FRANCIS, D.D. Ability for in-season correction of nitrogen deficiency in corn using chlorophyll meters. **Soil Science Society of America Journal**, v. 61, n. 4, p. 1233-1239, 1997.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting colonization ability of endophyticdiazotrophs from deep water Rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p.127-141, 2001.

VONARX, E.J.; MITCHELL, H.L.; KARTHIKEYAN, R.; CHATTERJEE, I.; KUNZ, B.A. DNA repair in higher plants. *Mutation Research*. v.400, p.187-200, 1998.

WANG, J. F.; LI, R. M.; LU, D.; MA, S.; YAN, Y. P.; LI, W. J. A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 921-925, 2009.

WEF, ASCE, EWRI (2005) *Biological nutrient removal (BNR) operation in wastewater treatment plants*. Manual of Practice n° 29 of WEF and Manuals and Reports on Engineering Practice n° 109 of WEF, ASCE, EWRI, WEF Press, McGraw-Hill, New York.

WHITE-JR, J. F. et al. A proposed mechanism for nitrogen acquisition by grass seedlings through oxidation of symbiotic bacteria. **Symbiosis**, p. 1–11, 2012.

WONG, T. S.; TEE, K. L.; HAUER, B.; SCHWANEBERG, U. Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic Acids Res.*, 32:e26, 2004.

YUAN, J. et al. Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. **Molecular systems biology**, v. 5, n. 302, p. 1–16, 2009.

ZABIHI, H.R.; SAVAGHEBI, K.; KHAVAZI, A.; GANJALI, M.; MIRANSARI, M. *Pseudomonas* bacteria and phosphorous fertilization, affecting wheat (*Triticum aestivum* L.) yield and P uptake under greenhouse and field conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, n.1, p.145-152, jan. 2011.

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**, Oxford, v.5, p. 539-554, 2003.

ANEXOS

ANEXO A
Meio JMV (BALDANI, 1996)

Manitol		5g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
Extrato de levedura		100 mg

Ajustar o pH para 5,0 – 5,4.

Completar para 1000 mL com água destilada.

Adicionar 1,6 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 25 g L⁻¹ para sólido.

Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio (1,87g/l) (indicador opcional).

ANEXO B

Tampão fosfato (ARAÚJO et. al, 2007)

K_2HPO_4	170 g	2 L H_2O
KH_2PO_4	68 g	1 L H_2O

Promover a mistura das duas soluções e ajustar o pH para 7,0.

Guardar em geladeira e diluir em água destilada na hora do uso.

ANEXO C

Meio L (SETTEN et al., 2013)

KH_2PO_4	1 g
K_2HPO_4	3 g
NaCl	2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,017 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,029 g
$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,144 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,147 g
NaMoO_4	0,038 g
Ácido cítrico	0,653 g
Glicose	5 g

Ajustar pH para 7,0

100 mg/L de extrato levedura (apenas para meio sólido)

1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (apenas para meio sólido e para pré-inóculo)

ANEXO D

Meio Dygs (RODRIGUES NETO, 1986)

Glicose	2 g
Ácido málico	2 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Acido glutâmico	1,5 g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%:

pH 6,0 para *Herbaspirillum*.

pH 6,0 para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico).

pH 6,8 para *Azospirillum*.

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

Adicionar 15g L⁻¹ de agar para meio sólido.

ANEXO E

Imagem digitalizada de raiz para análise por software gearoots

