

UNIOESTE – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

WALKYRIA NEIVERTH

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS  
ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE SOLOS DE DIFERENTES CLASSES E  
MANEJOS DE CULTIVO**

Marechal Cândido Rondon

2012

UNIOESTE – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

WALKYRIA NEIVERTH

**DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS  
ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE SOLOS DE DIFERENTES CLASSES E  
MANEJOS DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
*Strictu sensu* em Agronomia, como pré-requisito para a  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Co-Orientadora: Profa Dr<sup>a</sup>. Luciana Grange

Marechal Cândido Rondon

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon –  
PR., Brasil)

N417d	Neiverth, Walkyria <b>Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo</b> / Walkyria Neiverth. - Marechal Cândido Rondon, 2012. 105 p.  Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães Coorientador: Profa Dr <sup>a</sup> . Luciana Grange  Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2012.  1. Solo - Fixação biológica de nitrogênio. 2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. 3. Biodiversidade. 4. Solos - Manejo. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.  CDD 22.ed. 631.46 CIP-NBR 12899
-------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



Estado do Paraná

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Bióloga **Walkyria Neiveth**. Aos vinte e seis dias do mês de junho de 2012, às 08h30min, sob a presidência do Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Dissertação da Bióloga Walkyria Neiverth, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Mestrado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Odair Alberton (UNIPAR), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Grange (UFPR/PALOTINA), Prof. Cláudio Yuji Tsutsumi e Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).

Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE SOLOS DE DIFERENTES CLASSES E MANEJOS DE CULTIVO"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof. Dr. Odair Alberton.....Aprovada  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Grange.....Aprovada  
Prof. Dr. Cláudio Yuji Tsutsumi.....Aprovada  
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).....Aprovada

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 26 de junho de 2012.

Prof. Dr. Odair Alberton (UNIPAR)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Grange (Co-orientadora)

Prof. Dr. Cláudio Yuji Tsutsumi

Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador)

Não é preciso ter olhos abertos para ver o sol, nem é preciso ter ouvidos afiados para ouvir o trovão. Para ser vitorioso você precisa ver o que não está visível.

Sun Tzu

Aos meus pais, Arno e Marta, aos meus irmãos  
Adeline e Andréas e a todos que acreditaram  
na concretiza o deste ideal, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À coordenação do curso de pós-graduação em Agronomia - PPGA.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Vandeir Francisco Guimarães pela confiança, apoio e sugestões no decorrer do meu mestrado, como também pelo auxílio financeiro na aquisição de materiais de trabalho.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Luciana Grange por acompanhar diretamente a pesquisa durante estes dois anos, sempre auxiliando. Por indicar caminhos e soluções no decorrer do trabalho, como também pelo apoio e confiança dedicados a mim nos momentos em que mais precisei.

Ao engenheiro agrônomo Fabricio Isao Taname e à usina Goioerê pela disponibilidade de terreno e auxílio durante a coleta de solos, a qual foi a base deste trabalho.

À Embrapa, por ceder as sementes, o espaço na casa de vegetação e disponibilizar laboratórios, juntamente a materiais, equipamentos e reagentes, para que eu pudesse realizar meu experimento. Agradeço também aos funcionários da Embrapa, dentre eles a pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Mariangela Hungria, Ligia, Renan e Rinaldo que me auxiliaram no decorrer do experimento.

À UFPR, especialmente aos Laboratórios LABIOGEN e LABIOTEC coordenados pelos professores Eliane C. Gruszka Vendruscolo e Marise Fonseca dos Santos (LABIOGEN) e Nelson Luis Melo Fernandes (LABIOTEC), por ceder espaço para minha pesquisa.

À toda equipe FIXTEC, Luciana, Willian, Jean, Alcindo, Deisi, Thamara, Bruno e Danielle, em especial ao André e Everton, que foram meu “braço direito” no desenvolvimento do trabalho, sempre me auxiliando e apoiando.

Agradeço também ao Fábio, Pedro e Juliano, que não fazem parte do grupo FIXTEC, mas que auxiliaram no início do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao professor Dr. Milton Ferreira de Moraes pelo auxílio na classificação dos solos utilizados neste trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Lygia V. G. Terasawa do Departamento de Genética da UFPR, campus Curitiba, e Dr<sup>a</sup> Marise F. dos Santos do Departamento de Bioquímica e

Genética da UFPR, campus Palotina, pelo fornecimento das estirpes padrões utilizadas na caracterização genética deste trabalho.

Ao meu colega de laboratório Fernando Furlan, pela ajuda e companhia durante estes anos, tornando os momentos difíceis mais fáceis de serem superados.

Agradeço também à Raquel, Izabel, Cleuza, Adeline, Suellen, Dayane, Mariane, Isaac, Kleber, Wagner, Maik, Fernanda e Eliziane, colegas de laboratório por pelo menos um ano durante o mestrado, pelo apoio e pelos momentos descontraídos convividos juntos.

Aos meus colegas de mestrado por todos os momentos agradáveis, engraçados e outros difíceis convividos juntos.

Aos meus pais e irmãos, Arno, Marta, Adeline e Andréas, por me acompanharem nesta trajetória sempre me apoiando, transmitindo vibrações positivas mesmo eu acreditando não ser capaz. Por me ensinarem através de seus atos as principais virtudes de um pesquisador: humildade, honestidade e dedicação. Agradeço também por todo amor, carinho e compreensão que dedicaram a mim durante estes anos, sem este apoio seria impossível enfrentar esta jornada.

Ao meu namorado pelos momentos descontraídos convividos, pelo apoio, compreensão e paciência durante estes anos.

À Deus, meu Senhor, em quem confio integralmente, pela orientação nas decisões, pelo sustento na dificuldade e por atender minhas orações na hora exata. Por colocar todas essas pessoas no meu caminho e me mostrar a importância de cada uma delas através dos desafios e alegrias que apareceram durante essa jornada.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1	A Importância dos Micro-organismos de Solo.....	15
2.2	Aspectos Econômicos da Interação Planta-Bactéria.....	16
2.3	Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da Interação Bactérias Endofíticas e Plantas .....	18
2.4	Ecologia e Biodiversidade de Rizobactérias .....	22
2.5	Importância dos Estudos de Diversidade Genética de Bactérias Endofíticas .....	28
2.6	Principais Métodos Empregados em Estudos de Diversidade Genética de Bactérias Endofíticas.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Caracterização das Áreas de Coleta de Solos .....	37
3.2	Coleta de Solos .....	40
3.3	Isolamento das Estirpes de Endofíticos.....	41
3.4	Quantificação e Caracterização Morfológica das Colônias .....	43
3.4.1	Análise de Agrupamento dos Isolados Seleccionados com Base em suas Características Morfológicas .....	44
3.4.2	Índices de Diversidade e Riqueza com Base nos Perfis Morfológicos .....	45
3.5	Caracterização Genética das Estirpes .....	46
3.5.1	Extração de DNA .....	46
3.5.2	Amplificação do DNA pela Reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o “primer” Específico BOX A1R (rep-PCR) .....	48
3.5.3	Análise de Agrupamento dos Produtos Obtidos na Análise de rep-PCR.....	49
3.5.4	Índices de Diversidade e Riqueza Obtidos para as Populações de Endofíticos com Base na Análise de rep-PCR.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	Avaliação da Quantificação e Caracterização Morfológica dos Isolados.....	50
4.2	Análise de Agrupamento dos Produtos Obtidos por rep-PCR .....	57
4.3	Análise dos Índices de Diversidade e Riqueza Obtidos para as Populações de Endofíticos.....	61
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	66
6	CONCLUSÕES .....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

ANEXO

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização dos pontos de coleta no mapa do Estado do Paraná. A – Pontos de coleta das sub-amostras das regiões Noroeste (M2) e Centro Oeste (M1, M3, M4, M5, M6); B – Pontos de coleta das sub amostras da região extremo Oeste (M7, M8, M9, M10).  
.....37
- Figura 2. Distribuição estatística dos pontos de coleta de solo referentes as sub-amostras por repetição em relação à gleba (tipo de manejo), utilizados para obtenção dos isolados.  
.....40
- Figura 3. Quantificação do crescimento bacteriano pelo método de contagem do número de células viáveis presentes em uma suspensão (unidades formadoras de colônias - u. f. c.). A – Molde do quadrante central utilizado para quantificação de u. f. c por placa. B – Utilização do quadrante central no processo de quantificação de colônias viáveis presentes em uma suspensão.....43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das áreas de coleta em relação ao tipo de manejo de cultivo, classe de solo e manejo deste, perímetro municipal e região do estado do Paraná onde estas foram coletadas. ....	39
Tabela 2. Pontos de coleta das sub-amostras por repetição de acordo com cada tipo de manejo, obtidas por Global Positioning System (GPS). ....	41
Tabela 3. Média de unidades formadoras de colônias (u. f. c.), do número de colônias morfológicamente distintas e da altura das plantas de trigo após 30 dias de inoculação. ...	50
Tabela 4. Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grandes grupos (GG) da tipagem obtida pela análise das características morfológicas segundo Fonseca et al. (2000). ....	53
Tabela 5. Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grandes grupos (GG) do dendrograma obtido pela análise dos produtos de BOX-PCR. ....	58
Tabela 6. Índices de diversidade, estimados pela tipagem morfológica segundo Fonseca et al. 2000, de isolados obtidos de solos de diferentes classes e manejos de cultivo. ....	62
Tabela 7. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de <i>rep</i> -PCR amplificados pelo <i>primer</i> BOX, de isolados obtidos de solos de diferentes classes e manejos de cultivo. ....	62

## RESUMO

### DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE SOLOS DE DIFERENTES CLASSES E MANEJOS DE CULTIVO

O nitrogênio é um dos fatores mais limitantes da produção vegetal, porém sua disponibilização contínua pela agricultura através da aplicação de fertilizantes químicos acarreta em altos custos financeiros, energéticos e ambientais. Com intuito de reduzir estes custos, vários estudos vêm sendo realizados quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN) e utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Considerando-se a grande diversidade destes micro-organismos de solo ainda não catalogados, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas a partir de solos de diferentes classes e manejos de cultivo, a fim de isolar indivíduos com potenciais biotecnológicos para a FBN e para a promoção de crescimento vegetal (PCV). Bactérias foram isoladas a partir de solos diluídos e inoculados em plantas-iscas de trigo cultivadas em solução nutritiva. Após 30 dias, o tecido vegetal foi superficialmente esterilizado, macerado e uma alíquota plaqueada em meio de cultura generalizado, Dygs. O crescimento bacteriano foi quantificado pela contagem de unidades formadoras de colônias (u. f. c.) e as colônias aparentemente distintas foram caracterizadas morfológicamente. Com base nestes dados, foram escolhidas 400 estirpes, analisadas e agrupadas pela utilização do programa Past. A caracterização genética de 269 estirpes foi realizada pela reação de *rep*-PCR com “primer” específico BOX e os perfis polimórficos apresentados foram analisados e agrupados com auxílio do programa BioNumerics. Cálculos quanto aos índices de diversidade e riqueza morfo-genética foram realizados a partir do programa SPADE. Os manejos com sucessão milho - soja em sistema orgânico e milho - soja RR foram os que apresentaram maiores e menores médias de u. f. c., respectivamente. A grande biodiversidade encontrada nas diferentes classes de solos sob os manejos de cultivo das regiões avaliadas estabeleceram um total de 35 agrupamentos morfológicos e 25 agrupamentos genéticos. Quanto aos agrupamentos genéticos, verificou-se, além dos 25 GG formados, a obtenção de 16 perfis isolados quando comparados a 60% de similaridade. Nos agrupamentos morfológicos, observou-se maior número de perfis referentes à área de mata ciliar (M4), enquanto que o menor número foi observado no manejo de sucessão milho - soja orgânico (M10). Observou-se ainda, maior índice de diversidade, riqueza e grupos esperados em coleta futura no manejo com monocultivo de cana-de-açúcar, alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça (M1), sendo os menores índices referentes ao manejo com monocultivo de cana-de-açúcar com baixo teor de P e adubação mineral (M2). Quanto aos índices de diversidade e riqueza genética destaca-se o manejo M1 como sendo o de maior diversidade, porém os maiores índices de riqueza e grupos esperados em coleta futura foram observados no manejo de sucessão milho - soja (M9). Em contrapartida, os menores índices de diversidade e riqueza são apontados ao manejo M10, sendo a área com pousio (M5) a menos favorável ao desenvolvimento dos micro-organismos de acordo com o índice de grupos esperados em coleta futura. Os resultados demonstram uma alta diversidade em todas as regiões avaliadas, tanto para os diferentes manejos de cultivo, classes de solo quanto à vegetação característica das diferentes áreas, além da influência concomitante destes sobre a dominância de determinados grupos morfo-genéticos dentro da comunidade.

Palavras-chaves: Biodiversidade, bactérias, diazotróficos, FBN, BPCV, manejo, cultura, solo.

## ABSTRACT

### MORPHOLOGICAL AND GENETIC DIVERSITY OF ENDOPHYTIC RHIZOBACTERIA OBTAINED FROM SOIL OF DIFFERENT CLASSES AND CROP MANagements

Nitrogen is one of the limiting factors of crop production, but its continuous availability by applying chemical fertilizer in agriculture, will lead to high costs, both economic and environmental. To reduce these costs, several studies have been conducted regarding the biological nitrogen fixation (BNF) and use of plant growth-promoting bacteria (PGPB). Considering that the great diversity of soil microorganisms has not been yet catalogued, the goal of this work was to study the morphological and genetic diversity of endophytic rhizobacteria obtained from soils of different classes and crop managements in order to isolate individuals with potential for PGPB. Bacteria were isolated from diluted soils and inoculated in bait-plants of wheat grown in the nutrient solution. After 30 days, the plant tissue was superficially sterilized and macerated and an aliquot of serial dilutions was inoculated in selective medium Dygs with successive plating to obtain pure colonies. Bacterial growth was quantified by counting colony forming units (c.f.u.) and 400 morphologically distinct colonies were characterized: size, shape, color, edge, homogeneity, transparency, elevation, and mucus. Based on this information, the isolates were analyzed and grouped by using the program Past for morphological typing. From these 269 strains were genetically characterized by *rep*-PCR with specific primer. Polymorphic profiles obtained were analyzed and grouped with BioNumerics software. Calculations regarding the rates of morpho-genetic diversity and richness were performed by SPADE program. The managements with succession of corn and soybean in organic system (M10) and corn - soybean RR (M8) were the ones showing higher and lower c.f.u., respectively. The great biodiversity found in the various types of soil under different culture managements from evaluated regions have resulted in a total of 35 morphological and 25 genetics groups. As for genetic groups, there was, in addition to the 25 major groups, 16 profiles when used 60% of similarity. In morphological groups, it was observed greater number of profiles relating to riparian forest area (M4), whereas the smallest number was observed in succession corn and organic soybean on zero tillage (M10). It was found higher morphological diversity index, richness and groups expected in future collection management with monoculture of sugar cane, high levels of P in soil and application of vinasse (M1), being the lowest indexes for the monoculture management with sugar cane with low P in soil and mineral fertilization (M2). As for diversity indexes and genetic richness the M1 management stands out as showing the higher diversity indexes, but the highest rates of richness and groups expected in future collection were observed in the succession corn - soybean (M9) management. By contrast, the lowest rates of genetic diversity and richness were appointed by management with organic soybean on zero tillage. The results showed a high diversity in all areas assessed, both for the different cultivation managements, soil types, as to characteristic vegetation of the different areas, pointing the concomitant influence of these agri-environmental characteristics on the dominance of specific morpho-genetic groups within the communities.

Keywords: diversity, bacteria, diazotrophic, BNF, management, culture, PGPB, soil.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o 3º maior agronegócio do planeta segundo a World Trade Organization (WTO) (KASCHUK et al., 2011). Embora apresente solos com baixa disponibilidade de N e não possui subsídios para a reposição deste mineral por fertilização química (SALAMONE et al., 2010).

Entre os estados brasileiros, o Paraná caracteriza-se por ser um estado agrícola, responsável pela comercialização de grande parte das commodities agrícolas do país como cana-de-açúcar, soja, milho, trigo, feijão, algodão, café, entre outros. A importância das atividades agropecuárias e agroindustriais para a economia estadual é confirmada pelo número de exportações (FARJADO, 2006; IPARDES, 2011).

Cereais como arroz, milho e trigo, pertencentes à família das Poaceae, constituem a base da dieta de aproximadamente 6,5 bilhões de pessoas no mundo. O aumento na produtividade e no conteúdo protéico destes cereais está diretamente relacionado com o aumento na absorção de nitrogênio inorgânico (SAUBIDET et al., 2002; DÍAZ-ZORITA e FERNANDEZ-CANIGIA, 2009). De acordo com a FAO, em 2008 houve um incremento na produtividade destes cereais na ordem de 2,6%, fruto do alto uso de fertilizantes químicos (N, P, K) combinados a outras tecnologias (BHATTACHARJEE et al., 2008).

A adubação nitrogenada em culturas não leguminosas é uma das mais caras na agricultura (BHATTACHARJEE et al., 2008), pois cerca de 65% do N mineral aplicado é perdido no sistema solo-planta através de emissões gasosas tóxicas de óxido nitroso, erosão e lixiviação. Os impactos ambientais destas perdas vão desde o aumento no efeito estufa, diminuição da camada de ozônio estratosférico, eutrofização de rios e lagos, entre outros (REJESUS et al., 1999; HOWARTH et al., 2000; SHARMA et al., 2007).

Acredita-se que um dos principais fatores para o sucesso do Brasil quanto ao agronegócio seja a alta diversidade e eficiência de micro-organismos presentes no solo como, por exemplo, as bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal, de grande importância no suprimento de N nos mais diversos ecossistemas (MOREIRA et al., 2010). As bactérias fixadoras de N contribuem com 65% da entrada anual de N no solo (HUNGRIA et al., 2001a) e, no caso das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), favorecerem o crescimento das plantas pela produção/indução de compostos orgânicos necessários para a nutrição das plantas (KUSS, 2006).

Diante do exposto, várias alternativas estão sendo avaliadas para reduzir a dependência da fertilização química para estas culturas. Uma alternativa ao uso de

fertilizantes químicos é explorar e melhorar a capacidade de não leguminosas em obter nitrogênio através da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) gasoso (N<sub>2</sub>) (SAUBIDET et al., 2002; INIGUEZ et al., 2004). Processo similar ao apresentado entre *Rhizobium*-leguminosa, onde a simbiose supre cerca de 80% das necessidades de N pelas leguminosas (ORR et al., 2011).

A FBN é extremamente vantajosa em relação a aspectos ecológicos e econômicos (MUTHUKUMARASAMY et al., 2005). Se a FBN fosse disponível para os cereais (e/ou não leguminosas) num sistema associativo efetivo com algumas características do sistema simbiótico das leguminosas, isto poderia resultar numa redução significativa no uso de fertilizantes nitrogenados (KENNEDY et al., 1997).

Neste contexto, o conhecimento da diversidade fenotípica e genética das populações presentes na rizosfera pode auxiliar na compreensão de como as variações no ambiente podem ter influência na funcionalidade destas populações. A interação de rizobactérias com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o uso de adubos nitrogenados, e conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais (MOREIRA et al., 2010).

O trabalho teve como objetivo geral estudar a biodiversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas a partir de solos de diferentes classes e manejos de cultivo, a fim de isolar indivíduos com potenciais biotecnológicos para a FBN e para a promoção de crescimento vegetal (PCV).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A Importância dos Micro-organismos de Solo**

A fração biológica do solo ou a chamada fauna edáfica, é composta por uma grande diversidade de espécies de pequenos animais (mesofauna) e micro-organismos (microfauna e microflora). As relações e interações metabólicas entre essas comunidades interferem diretamente nos ciclos biogeoquímicos do planeta porque são considerados os principais responsáveis pela degradação enzimática de restos orgânicos para posterior decomposição, transformação e distribuição de nutrientes no solo (ARAÚJO e HUNGRIA, 1994).

Um bom exemplo da importância das atividades metabólicas microbianas para a sustentabilidade dos solos nos diferentes sistemas é a matéria orgânica (MO), principal componente de fertilidade nos trópicos. A MO funciona, de maneira geral, como um componente que equilibra o sistema de produção. Ela governa a maior parte das atividades que ocorrem no solo, organiza o solo do ponto de vista nutricional e aumenta a capacidade do solo de reter íons (REZENDE et al., 2003).

A manutenção da MO implica em uma boa aeração e/ou descompactação do solo para permitir oxigenação e melhor circulação de água na rizosfera. Este procedimento aliado a outros tratamentos culturais permite, dentre outros fatores, a ação não só dos indivíduos aeróbicos, mas também de fungos e da macrofauna do solo que auxiliam na decomposição do material depositado. O solo é considerado um recurso natural de grande utilidade para o homem devido a vida que existe nele, sem a presença dessa parte viva, o solo seria simplesmente uma mistura de areia, silte e argila (MENDES e REIS JÚNIOR, 2010).

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos micro-organismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (STALEY, 1998). O conhecimento da biodiversidade e bioprospecção de novos micro-organismos tornaram-se uns dos focos principais da era biotecnológica, visto que a utilização destes organismos na busca de soluções nas áreas de alimento, saúde, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada no atual cenário mundial.

O potencial biotecnológico desenvolvido pelos micro-organismos existe graças a sua grande diversidade metabólica e adaptabilidade genética (COUTINHO et al., 2001), o que os torna uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e desenvolvimento sustentável. Os recursos microbianos utilizados na indústria visam, por exemplo, a utilização destes na produção de compostos comerciais ou na transformação de

substratos em produtos de maior valor agregado. Na agropecuária destacam-se as bactérias capazes de fixar nitrogênio, o uso de micro-organismos no controle biológico de pragas, doenças e vetores. Sua utilização na área de alimentos está voltada à produção de bebidas, panificação, queijos, ácidos orgânicos, enzimas, dentre outros. Na área ambiental, as perspectivas de recuperação do meio ambiente através da biorremediação são bastante promissoras e dependentes de novos isolados (OLIVEIRA et al., 2006a).

Outros benefícios obtidos a partir das ações dos micro-organismos do solo que podem assegurar a produtividade com qualidade ambiental são: o estoque de micro-organismos e invertebrados de solos que permitem o controle biológico natural; a participação de micro-organismos na manutenção dos ciclos naturais da água, da energia, do nitrogênio e do carbono, entre outros; as associações simbióticas; a resistência genética, que pode advir de genes microbianos e; as possíveis descobertas de novas espécies de importância econômica (REIS JUNIOR e MENDES, 2007).

Em forrageiras, Chávez et al. (2011) avaliaram grandes alterações na diversidade funcional da microbiota e a atividade dos micro-organismos do solo pela intensidade do pastejo. Esta diversidade seria proporcional para as condições do cultivo, e também poderia ser utilizada como indicadora de qualidade do solo (IQS).

## **2.2 Aspectos Econômicos da Interação Planta-Bactéria**

Após a água, o nitrogênio (N) é geralmente o fator mais limitante da produção vegetal. Culturas como arroz, trigo, e milho necessitam cerca de 20-40 kg de N ha<sup>-1</sup> em um período correspondente a 3-5 meses para satisfazer as necessidades deste elemento por tonelada de grão produzido (ORR et al., 2011).

No Brasil, mais de 100 milhões de toneladas de adubos são anualmente utilizados pela agricultura, sendo aproximadamente 60% deste valor destinado ao cultivo de cereais (NEWTON, 2000; LADHA et al., 2005; MACEDO, 2007; SALA et al., 2007). Em culturas não leguminosas, a adubação nitrogenada é um dos maiores custos. Vale ressaltar que aproximadamente 65% desse adubo é perdido no sistema solo-planta, uma demanda que implica grandes custos financeiros, energéticos e, sobretudo, ambientais (BHATTACHARJEE et al., 2008), porém, se não forem supridos adequadamente na quantidade e época ideal se torna o principal responsável pela queda de produção (SALA et al., 2005; WENDLING, 2005).

O custo econômico para a síntese química de fertilizantes nitrogenados é resultante principalmente da necessidade de gasto de fontes de petróleo, ou seja, energia não renovável. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, sejam necessários seis barris de petróleo (GRANGE et al., 2007). De acordo com alguns estudos, verifica-se um desnível entre o volume de produção (utilização do petróleo) e o das reservas descobertas. A partir de 1981, o mundo começou a usar mais petróleo do que descobria, atingindo em 2005, um consumo de cinco barris de petróleo para cada barril encontrado (CAMPBELL, 2006; SACHS, 2007).

O custo ambiental implica na eutrofização de lagoas, na acidificação de solos cultiváveis que, por sua vez, provocam aumento das perdas de oligonutrientes, na liberação de metais pesados do solo para os sistemas aquíferos, na redução do ozônio estratosférico, chuvas ácidas, alterações no efeito estufa e mudanças no ciclo de N global. Estes prejuízos relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste fertilizante sem que haja diminuição da produção e investimento (BHATTACHARJEE et al., 2008), ou seja, a FBN, a qual despertou maiores interesses a partir de 1970 (MARX, 2004).

Em leguminosas, a FBN realizada por *Rhizobium* sp. supre cerca de 80% das necessidades de N nestas espécies (ORR et al., 2011). Com esse processo, a economia anual de recursos que seriam utilizados para a compra de adubos nitrogenados é da ordem de US\$ 6 bilhões, apenas no caso da soja. Sem o rizóbio, a soja brasileira teria seu custo de produção muito elevado afetando diretamente sua competitividade no mercado mundial (MENDES e REIS JÚNIOR, 2010).

Em não leguminosas, não há evidências de uma relação tão complexa e organizada quanto a presente nas simbioses, devido ao fato de que a seleção de estirpes eficientes ainda necessita de maiores estudos por ser genótipo e manejo dependente (REIS JUNIOR et al., 2002; MOREIRA et al., 2010, COMPANT et al., 2010). Moreira et al. (2010) constataram que os ganhos de N em Poaceae estão em torno de 25 a 50 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> correspondente a 17% da demanda nutricional total.

Dados econômicos sobre os efeitos da FBN nas culturas são inexatos. Na cana-de-açúcar, por exemplo, cultura altamente extratora de N do ambiente, podendo acumular cerca de 120 a 300 Kg de N na planta ha<sup>-1</sup>, aproximadamente 70% desse N são retirados da área durante a colheita com a retirada dos colmos, e em caso da queima que antecede a colheita, o restante do N é perdido (ORLANDO FILHO et al., 1980; OLIVEIRA et al.,

1994). Calcula-se que a FBN poderia contribuir com 60 a 80% das necessidades totais de N desta cultura (URQUIAGA et al., 1992; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

No sistema de cultivo irrigado de arroz, a adubação nitrogenada tem 40% de aproveitamento, sendo o restante perdido por volatilização, lixiviação e desnitrificação, o que torna necessária a aplicação de fertilizantes químicos em doses elevadas, acarretando na contaminação ambiental, além da redução de lucros pelo alto custo do fertilizante (FAGERIA et al., 2003). A FBN poderia contribuir com estas demandas no arroz irrigado com rendimentos de até 50 kg ha<sup>-1</sup>cultivo<sup>-1</sup> de N, resultado da atividade de várias espécies de diazotróficos associados (NEVES e RUMJANEK, 1998; CRUZ et al., 2001).

### **2.3 Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da Interação Bactérias Endofíticas e Plantas**

As BPCV (no inglês PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ou diazotróficas apresentam uma grande diversidade de bactérias. Estas podem ser classificadas como rizobactérias benéficas, deletérias ou neutras de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal (DOBBELAERE et al., 2003). Estas bactérias podem afetar o crescimento das plantas pela produção/indução de compostos orgânicos necessários para a nutrição das plantas (KUSS, 2006).

O nitrogênio está presente de muitas formas na biosfera. A atmosfera terrestre contém aproximadamente 79% de nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>), destes, 0,04% são encontrados na ecosfera terrestre de forma combinada, onde 57% estão na forma orgânica e 43% na forma inorgânica (KERBAUY, 2008).

A maior parte do nitrogênio atmosférico não está disponibilizado diretamente aos organismos vivos. Sua obtenção requer a quebra da ligação tripla entre dois átomos de nitrogênio para a produção de amônia (NH<sub>3</sub>) ou nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Estas reações são conhecidas como fixação de nitrogênio que podem ser realizadas por processos industriais (fabricação de fertilizantes nitrogenados) ou por processos naturais (TAIZ e ZEIGER, 2009). De acordo com Schlesinger (1997) existem três processos naturais responsáveis pela fixação de nitrogênio: os relâmpagos (8%) e as reações fotoquímicas (2%) que fixam N<sub>2</sub> na forma de HNO<sub>3</sub>, e a FBN realizado por bactérias ou algas azuis (90%) em que fixam N<sub>2</sub> na forma de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). De acordo com Binotti (2009) e Floss (2008) as plantas superiores são capazes de absorver o nitrogênio na forma de aminoácidos, uréia, amônio e predominantemente sob a forma de nitrato. A adição do nitrogênio no solo pode ocorrer

tanto através de fertilizantes químicos, processos industriais, quanto por meio da água da chuva e da própria FBN, processos naturais (MALAVOLTA, 2006).

Vários fatores ambientais podem influenciar a fixação de N nos solos: umidade, oxigenação, pH, qualidade e quantidade de carbono, presença de elementos como molibdênio, cobalto, ferro e vanádio além da própria disponibilidade de N (CERETTA et al., 2005; HSU e BUCKLEY, 2009).

A mais eficiente relação desenvolvida é a simbiose de estirpes de Proteobacterias com plantas da família Leguminosae. Nesta simbiose, as bactérias fornecem à planta hospedeira o N fixado em troca de nutrientes e carboidratos, usados no metabolismo bacteriano (BURRIS, 1991). Este processo ocorre nos nódulos formados nas raízes dos vegetais contendo bactérias fixadoras (PERIN, 2007). Enquanto no sistema leguminosa-*Rhizobium*, os endofíticos são restritos a um compartimento específico, nas não leguminosas as bactérias endofíticas aparecem nas raízes, caules e folhas (BHATTACHARJEE et al., 2008).

A FBN só é possível devido a presença do complexo nitrogenase (altamente conservado entre os procariotos) presente nas bactérias diazotróficas que permite a conversão do nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) para suas formas mais reduzidas, como íons amônia ( $NH_3$ )<sup>+</sup>, podendo assim, ser utilizado pelos seres vivos. A capacidade de redução de N atmosférico conferida pelo complexo nitrogenase ocorre devido à presença de duas metaloproteínas, a proteína ferro (dinitrogenase redutase) e a proteína molibdênio-ferro (dinitrogenase), assim denominadas devido o metal componente das proteínas (DEAN et al., 1993; KIM e REES, 1994).

Estas proteínas componentes do sistema enzimático nitrogenase são reguladas por vários fatores como disponibilidade de energia da célula, idade fisiológica, quantidade de N na planta, concentração de oxigênio no ambiente, entre outros (REIS et al., 2006). Essas proteínas são rápida e irreversivelmente inativadas por exposição ao oxigênio (POSTGATE, 1982) e, de acordo com alguns estudos, o oxigênio é responsável por causar uma sequência de mudanças provavelmente associadas com vários estados de oxidação dos átomos de ferro (ROBSON e POSTGATE, 1980).

Devido ao fato da FBN ser estritamente anaeróbica e nem todos os micro-organismos diazotróficos serem anaeróbicos, os diazotróficos aeróbicos desenvolveram alguns mecanismos como, proteção respiratória, produção de exopolissacarídeos e heterocistos para impedir que o oxigênio interfira no processo da nitrogenase (MOREIRA

e SIQUEIRA, 2006). Aos que não apresentam estes mecanismos de proteção, a FBN só é possível quando a taxa de dissolução de oxigênio no ambiente estiver em equilíbrio com sua taxa de consumo pela respiração, em valores bem menores aos 20% da atmosfera livre (SILVA, 2010).

A possibilidade de um nicho não nodular para a fixação endofítica de nitrogênio em Poaceae e outras não leguminosas tem estimulado bastante a realização de experimentos objetivando a verificação do estabelecimento de diazotróficos nos espaços intercelulares (COMPANT et al., 2005).

A maioria das BPCV são capazes de produzir fitormônios, tais como ácido 3 - indol acético (AIA), ácido abscísico, etileno, zeatina, várias giberelinas e outras auxinas/citocininas produzidas por bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (KHALID et al., 2004; FENG et al., 2006; MAGNANI et al., 2010). O fitormônio AIA, por exemplo, é uma auxina promotora do crescimento radicular como também podendo atuar no crescimento apical de plantas. Os fitormônios estariam envolvidos no mecanismo de associação planta-bactéria (PEDRAZA, 2008), além de promoverem o crescimento vegetal pela alteração na morfologia das raízes, aumentando o número e/ou comprimento, além de promover o desenvolvimento de um maior número de raízes laterais (SALA et al., 2005; SPAEPEN et al., 2008; SHAHAROONA et al., 2008). O aumento na superfície das raízes promoveria o aumento na capacidade de absorver nutrientes e água. Algumas bactérias, como por exemplo, do gênero *Bacillus*, *Herbaspirillum* e *Acetobacter*, são capazes de produzir altos níveis de giberelinas, favorecendo assim, o crescimento da parte aérea das plantas (BASTIAN et al., 1998; GRAY e SMITH, 2005).

Outra característica apresentada no metabolismo das plantas em associação com BPCV é a promoção do crescimento vegetal através de alterações nos níveis de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) na planta. A ACC é precursora do etileno, fitormônio responsável por promover o aumento na estatura das plantas, peso de raízes e da biomassa, conforme observado em plantas de milho associadas à presença de N (SHAHAROONA et al., 2006). A promoção de crescimento vegetal é dependente da concentração deste fitormônio na planta, sendo favorecido quando presente em baixa quantidade (GLICK, 1995), porém, induzindo senescência quando presentes em alta concentração na planta (PIERIK et al., 2006).

A produção da ACC deaminase por determinadas BPCV seria o principal fator responsável pela promoção do crescimento vegetal. Esta enzima denominada de ACCd é responsável por reduzir os níveis da ACC na planta, degradando-as, diminuindo por conseguinte, os níveis de etileno (KHALID et al., 2004). Deste modo, baixos níveis de etileno propiciariam o crescimento e alongamento das raízes (GLICK, 1995). Portanto, a presença da ACC deaminase e de auxinas estão positivamente correlacionadas com o crescimento da planta hospedeira.

Creus et al. (2004) citam que plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum* e afetadas por déficit hídrico no período de antese apresentaram maior tolerância à seca devido a um aumento no sistema radicular, proporcionando maior produtividade e qualidade dos grãos. Por outro lado, Barka et al. (2006) propõem que a tolerância à seca aconteceria devido a um aumento no conteúdo de prolina e compostos fenólicos pela colonização bacteriana, proporcionando uma maior adaptação ao estresse hídrico. Barua et al. (2012) isolaram estirpes de *Rhizobium* (*Agrobacterium*) e *Bacillus* capazes de gerar aumento na formação de biomassa e produção em cultura de arroz, além de apresentar ótimas características como biofertilizantes em condições salinas.

Pedraza (2008) relata que as BPCV também favoreceriam a solubilização de fosfatos através da produção de ácidos, que atuam sobre o P insolúvel ou na formação de sideróforos, compostos de baixo peso molecular secretados pelas raízes das plantas. Além disso, as bactérias poderiam capturar ferro (Fe) na rizosfera (LOREDO-OSTI et al., 2004).

Babalola (2010) cita a promoção de crescimento de plantas pela produção de vitaminas (*Pseudomonas*) e aminoácidos por outras BPCV, elementos considerados cruciais no metabolismo vegetal.

As bactérias diazotróficas poderiam atuar na sanidade vegetal, promovendo indiretamente o crescimento vegetal. A inibição do crescimento de organismos antagônicos ocorreria pela formação de metabólitos como o 2,4 - Diacetilfloroglucinol (DAFG) e ácido cianídrico (HCN) que atuam como compostos antifúngicos, anti-helmínticos e contra outros agentes causadores de doenças radiculares (UTKHEDE et al., 1999; DOBBELAERE et al., 2003; BABALOLA, 2010). A produção de antibióticos como as fenazinas, oomicinas A, pioletuorinas, tropoloninas entre outros foram observadas em várias bactérias (*Bacillus*) resultando vantagens competitivas às plantas (CHOUDHARY e JOHRI, 2009; COMPANT et al., 2010).

Na literatura, também está bem documentada que BPCV poderiam ativar um mecanismo de indução de resistência sistêmica a patógenos (IS) (van PEER et al., 1991) pela fortificação da parede celular vegetal e/ou alteração das respostas metabólicas e fisiológicas da planta (SHARMA et al., 2007).

Além da importância agrícola, as rizobactérias teriam aplicações na recuperação de sítios contaminados pela presença de poluentes tóxicos. Os processos denominados “landfarming” (óleos residuais da indústria petrolífera e derivados) utilizariam micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos (CANHOS et al., 1998). Rojas-Tapias et al. (2012) observaram que rizobactérias (*Pseudomonas*, *Acinetobacterias* e *Enterobacterias*) apresentariam a capacidade de acumular cobre (Cu II), podendo serem úteis na biorremediação de solos contaminados com metais pesados. Outros poluentes ambientais como benzeno, tolueno, etanol e xileno foram degradados por bactérias do gênero *Herbaspirillum* (MOORE et al., 2006; ROESCH et al., 2008).

## 2.4 Ecologia e Biodiversidade de Rizobactérias

A rizosfera, considerada o maior ecossistema da Terra (BUCHENAUER, 1998; BOTTLNER et al., 1999), é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob influência imediata do sistema radicular. Essa zona é rica em nutrientes, devido ao acúmulo de uma variedade de compostos orgânicos liberados pelas raízes por exsudação, secreção e deposição. Essas substâncias químicas apresentam estruturas formadas basicamente por carbono, **hidrogênio**, **oxigênio**, **nitrogênio**, **enxofre**, **fósforo**, **boro**, **halogênios**, dentre outras. Essas moléculas são fundamentais para os processos metabólicos microbianos e vegetais.

As rizobactérias (bactérias que se associam às plantas colonizando suas raízes) podem ser classificadas em quatro principais grupos: Diazotróficos PCV, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e Rhizobia (BARRIUSO et al., 2008).

Os diazotróficos compreendem ampla gama de micro-organismos procariotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas, dentre elas as diazotróficas promotoras de crescimento vegetal, que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Existem três tipos de organismos diazotróficos: os de vida livre, os que vivem associados a outros organismos e os que vivem em simbiose com outros organismos (AHMAD et al., 2008).

Tal diversidade garante não só a resiliência dos processos que estes micro-organismos de solo mediam em um determinado ecossistema como, por exemplo, a FBN e a PCV, mas também a ocorrência destes nos mais diferentes habitats terrestres conferindo-lhes alta capacidade de adaptabilidade fenotípica e genética (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de várias espécies de importância agrícola como: poaceas e palmeiras (BALDANI et al., 1997b; FERNANDES et al., 2001; SALA et al., 2005; CARVALHO et al., 2006; PRAYITNO e ROLFE, 2010; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011); orquídeas (LANGE e MOREIRA, 2002); tubérculos (BALOTA, et al., 1997; 1999); cafeeiros (JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1997; SANTOS et al., 2001); araucárias (NERONI e CARDOSO, 2007) e fruteiras (RAO, 1983; WEBER et al., 1999). Há relatos também de ocorrência em solos contaminados com metais pesados (MOREIRA et al., 2008); em solos tratados com resíduos siderúrgicos e biossólidos industrial (MELLONI et al., 2000); em áreas sob reabilitação de bauxita (MELLONI et al., 2004; NÓBREGA et al., 2004) e em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (SILVA, 2006).

Segundo Moreira et al. (2010), a ocorrência de diazotróficos associativos até então descritas pode ser representada pelas seguintes espécies: *Azotobacter chroococcum* (DÖBEREINER, 1953), *Azorhizophilus* (syn. *Azotobacter*) *paspali* (DÖBEREINER, 1966), *Azospirillum brasilense* /*A. lipoferum* (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987), *A. amazonense* (MAGALHÃES e DÖBEREINER, 1984; BALDANI et al., 1984; LANGE e MOREIRA, 2002), *A. halopraeferans*, *Leptichloa fusca* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. doebereinae*, *Miscanthus* spp. (ECKERT et al., 2001), *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005), *A. mellis*, *Melinis minutiflora* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007a), *A. zae* (MEHNAZ et al., 2007b), *Alcaligenes faecalis* (YOU et al., 1988), *Azoarcus indigens*, *A. communis* (REINHOLD-HUREK et al., 1993), *Paenibacillus durus* (syn. *Bacillus azotofixans*) (SELDIN et al., 1984; SELDIN e DUBNAU, 1985), *Bacillus* spp. (NEAL e LARSON, 1976), *Bacillus megaterium* (de BARY, 1884), *B. cereus* e *B. licheniformis* (DAFFONCHIO et al., 1998; XIE et al., 1998), *Paenibacillus brasilensis* (VON DER WEID et al., 2002), *Beijerinckia fluminensis* (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958), *Beijerinckia* spp. (DÖBEREINER, 1961; RUSCHEL, 1975; MAGALHÃES e DÖBEREINER, 1984), *Burkholderia vietnamiensis* (GILLIS et al., 1995), *B. kururiensis* (syn. *B. brasiliensis*) (BALDANI et al.,

1997a; CRUZ et al., 2001), *B. tropica* (syn. *B. tropicalis*) (REIS et al., 2004; CRUZ et al., 2001), *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), *B. silvatlantica* (PERIN et al., 2006), *B. terrae* (YANG et al., 2006), *B. ginsengisoli* (KIM et al., 2006), *Arcobacter* (syn. *Campylobacter*) *nitrofigis* (McCLUNG e PATRIQUIN, 1980; McCLUNG et al., 1983) *Derxia* spp. (CAMPÊLO e DÖBEREINER, 1970; MAGALHÃES, 1981), *Enterobacter* spp. (*agglomerans*, *cloacae*, *aerogenes*) (KORHONEN et al., 1989; FERNANDES et al., 2001), *Gluconacetobacter* (syn. *Acetobacter*) *diazotrophicus* (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; PAULA et al., 1991; TAPIA-HERNANDEZ et al., 2000), *Gluconacetobacter johanna*e e *G. azotocaptans* (FUENTES-RAMIREZ et al., 2001); *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1992; CRUZ et al., 2001), *Herbaspirillum* (syn. *Pseudomonas*) *rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1992; CRUZ et al., 2001), *Herbaspirillum frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001), *Klebsiella* spp. (*K. planticola*, *K. oxytoca*) (YOU et al., 1986) e *Sphingomonas paucimobilis* (FERNANDES et al., 2001).

As rizobactérias do gênero *Bacillus* spp. constituem 95% dos bacilos gram-positivos presentes no solo, os outros 5% representam os gêneros *Arthrobacter* spp. e *Frankia* spp. O gênero *Bacillus* spp. é caracterizado por apresentar indivíduos capazes de produzir fitormônios e indivíduos capazes de produzir endósporos, característica muito valorizada por proporcionar facilidades no manuseio, além de permitir a sobrevivência da espécie sob condições adversas, proporcionando uma certa vantagem quanto ao seu uso comercial (CHANWAY et al., 2000; GARBEVA et al., 2003; GARCIA et al., 2004; BARRIUSO et al., 2008). Além disso, são reconhecidas pela sua eficiência na utilização no controle biológico e capacidade de produzir antibióticos (FREITAS e PIZZINATTO, 1997; KOKALIS-BURELLE et al., 2002).

Entre as bactérias gram-negativas presentes no solo, as *Pseudomonas* spp. constituem o gênero mais abundante na rizosfera. Apresentam alta diversidade ecológica, caracterizam-se por serem produtores de antibióticos, sideróforos ou ácido cianídrico, aumentando a disponibilidade de certos nutrientes para a planta e atuam no controle biológico por serem capazes de inibirem o crescimento de outros micro-organismos nocivos (FERNANDES et al., 2001; PATTEN e GLICK, 2002; GUTIÉRREZ MAÑERO et al., 2003; GARCIA et al., 2004; CHAREST et al., 2005). Além da capacidade de promoção de crescimento e controle biológico, estudos realizados com diferentes espécies do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp. descrevem seu potencial quanto a capacidade

de degradar compostos xenobióticos, atuando portanto, na conservação do meio ambiente e na biorremediação de solos contaminados (BUNDY et al., 2004; NEUMANN et al., 2004).

O grupo Rhizobia, composto por vários gêneros como: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium* (BHATTACHARJEE et al., 2008), muito conhecido pela capacidade de simbiose com leguminosas e alta eficiência na FBN neste grupo, podem apresentar-se como BPCV quando associados à raízes de plantas não leguminosas em uma relação não-específica, conforme apresentado por Osorio Filho (2009) e Yanni e Dazzo (2010) no uso de rizóbios como inoculante na cultura de arroz. A associação de *Azorhizobium caulinodans* em raízes de trigo e arroz foi observada por Reddy et al. (1997) e Webster et al. (1997). A produção de sideróforos e de ácido cianídrico, tanto como aumento na disponibilidade de fosfato melhorando a nutrição de plantas também podem ser observadas neste grupo (YANNI et al., 1997; ANTOUN et al., 1998; LUPWAYI et al., 2004).

Durante este processo em leguminosas, a bactéria se fixa à superfície do pêlo radicular e, através de enzimas pectínolíticas e enzimas que degradam celulose e hemicelulose, induzem a síntese de uma fina camada de parede celular, formando o cordão de infecção por onde as bactérias invadem o interior do córtex. A adesão da bactéria à superfície do pêlo radicular provocam o curvamento deste, deformando-o. Juntamente ao processo de infecção, as bactérias passam por vários processos de multiplicação celular. A junção destes processos resultam na formação dos nódulos (PERRET et al., 2000; REIS e OLIVARES, 2006).

Em plantas não leguminosas, a associação com os diazotróficos ocorre através da colonização da superfície, na camada mais interna do córtex (associação epifítica) e/ou interior das raízes, colmo e, especialmente nos espaços inter/intracelular do parênquima e vasos condutores, podendo chegar à parte aérea da planta (associação endofítica) (REIS JUNIOR et al., 2002; BALDANI e BALDANI, 2005; GRAY e SMITH, 2005).

O termo endofítico inclui todos os organismos que são capazes de colonizar em algum momento do seu ciclo de vida, o interior dos tecidos das plantas sem causar aparente dano ao hospedeiro. Estes podem ser divididos em dois grupos: os endofíticos obrigatórios, que estão presentes no espaço inter/intracelular de raízes das plantas e os endofíticos facultativos, que podem também colonizar a rizosfera (BALDANI et al., 1997b).

Acredita-se que bactérias diazotróficas endofíticas apresentam vantagem quanto à eficiência na FBN quando comparados aos demais diazotróficos. Estes ocupam nichos

protegidos, com baixo teor de oxigênio, o que garante maior eficiência da enzima nitrogenase. Desta forma, além de possuir maior acesso as fontes de carbono podem transferir com maior eficiência os compostos nitrogenados produzidos às plantas (DOBBELAERE, 2003).

Para que ocorra a associação planta-bactéria, sinais moleculares devem ser trocados (quimiotaxia) entre a bactéria e a planta durante o início da interação, resultando na colonização do tecido vegetal pelos micro-organismos (JONES e DARRAH, 1994; MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; MARK et al., 2005; COMPANT et al., 2010).

As interações ou quimiotaxia geradas pelos exsudados radiculares promoveriam uma associação diferencial entre as rizobactérias e as plantas e, seriam dependentes de fatores tais como: genótipo da planta hospedeira, exposição a estresses bióticos e abióticos, idade e/ou estágio de desenvolvimento e anatomia radicular (LUGTENBERG et al., 2001; HAICHAR et al., 2008). Knee et al. (2001) citam que a presença de mucilagem (polissacarídeos) nas raízes seria um catalisador da quimiotaxia.

Acredita-se que a presença de exsudados e/ou mucilagem atrairia todos os tipos de micro-organismos (benéficos, neutros e também os de efeito deletério) para as plantas. Diante disso, os metabólitos secundários, compostos tóxicos, produzidos pelas plantas promoveriam a seleção daqueles que confeririam vantagens à associação específica planta-bactéria (de SOUZA et al., 2003; COMPANT et al., 2010).

Mark et al. (2005), observaram que a quimiotaxia bacteriana envolveria a expressão diferencial do gene *cheY* codificando a resposta de 2 componentes reguladores, *cheA* (regulador da resposta quimiostática) e o *pctA* (codificando a proteína transdutora do sinal molecular) observados como sendo genótipo específico e regulados por exsudados de raízes em beterraba (*Beta vulgaris*). Em *Pseudomonas*, o sistema SBW25 correspondente a um grupo de 20 genes envolvidos na regulação da associação está sendo caracterizado (MOON et al., 2008).

O Quorum sensing (sensor de quorum) corresponde a um processo de comunicação intra e interespecies microbianas, que permite aos micro-organismos apresentarem alterações fenotípicas marcantes quando estes se encontram em altas densidades populacionais. Além disso, a capacidade de muitas bactérias em controlar a expressão de certas funções de uma célula a partir da produção e liberação de moléculas de sinalização para o meio (produção de antibióticos, FBN) pode controlar a infecção da bactéria nas

plantas. Este controle influenciará na distribuição de comunidades bacterianas ao longo da rizosfera (COMPANT et al., 2010; BABALOLA, 2010).

Em geral, a penetração das bactérias nas plantas pode ocorrer através de aberturas naturais (estômatos, hidatódios, nectários, lenticelas), ou através de injúrias e feridas (tricomos quebrados, emergência de raízes laterais, feridas) (REIS e OLIVARES, 2006). No caso das rizobactérias endofíticas, acredita-se que as raízes sejam a principal “porta de entrada”, as quais conseguem penetrar pelos locais que foram danificados naturalmente devido ao próprio crescimento da planta, como por exemplo, nos pontos de emergência de raízes laterais ou adventícias, nas junções das raízes primárias com as secundárias, nos pêlos radiculares, ou ainda entre células epidérmicas intactas (SCHWAB, 2006; SALA et al., 2007). Nas últimas duas situações, a bactéria produz enzimas (celulases e pectinases) capazes de degradar as paredes celulares da planta hospedeira (SALA et al., 2007, COMPANT et al., 2010).

A entrada de rizobactérias através das junções de raízes primárias e secundárias, principalmente nos pontos de emergência das raízes laterais, pode ser claramente demonstrada em plantas de arroz inoculadas com *Burkholderia cepacia* marcadas com proteína verde fluorescente, sugerindo ser este, o principal local de entrada dos endófitos no interior das raízes de plântulas de arroz (SHARMA et al., 2008). Reddy et al. (1997) e Webster et al. (1997) também puderam verificar a entrada de *Azorhizobium caulinodans* em raízes de trigo e arroz pelos pontos de emergência de raízes laterais.

Para ocorrer a colonização intracelular, a parede celular primária e/ou secundária precisam ser degradadas. Em *Azoarcus sp.* BH72 foram observados genes codificando celulases e poligalactorunases que teriam a função de facilitar a dispersão bacteriana internamente na planta, alcançando os vasos do xilema e floema (JAMES et al., 2002; LODWYCKX et al., 2002; KRAUSE et al., 2006). A sua dispersão na planta ocorreria pelos flagelos bacterianos e fluxo transpiratório das plantas (JAMES et al., 2002; COMPANT et al., 2010).

As bactérias diazotróficas poderiam também controlar a comunidade bacteriana ativando a expressão de genes que induziriam uma resistência sistêmica a patógenos (IS). A planta diferenciaria fitopatógenos de endofíticos provavelmente pela secreção de diferentes compostos ou pelo controle de quantidade de compostos secretados (COMPANT et al., 2010). Em dicotiledôneas, o ácido salicílico e o etileno estariam envolvidos no controle destas rizobactérias (INIGUEZ et al., 2005). Em monocotiledôneas,

Miché et al. (2006) observaram em *Azoarcus* sp que a presença de ácido jasmônico seria a principal molécula de controle.

O conhecimento da biodiversidade destas rizobactérias é essencial para proporcionar avanços no conhecimento das populações rizobacterianas e suas aplicações na agricultura, proteção do ambiente e na biotecnologia.

## **2.5 Importância dos Estudos de Diversidade Genética de Bactérias Endofíticas**

Dentro da biodiversidade dos sistemas agrícolas incluem-se as bactérias diazotróficas endofíticas, as quais servem de fonte a vários estudos que vêm sendo realizados a fim de provar a eficiência destas em associação com diferentes culturas, além das tentativas de se encontrar novas estirpes de grande importância biotecnológica capazes de suprir as necessidades esperadas através dos estudos de diversidade genética (AHMAD et al., 2008).

De acordo com um levantamento de dados quanto à diversidade genética de bactérias diazotróficas realizados por Gaby e Buckley (2011) em estudos sobre riqueza taxonômica, baseados em sequências completas do gene *nifH* datados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), pode-se verificar que a maior diversidade de diazotróficos apresenta-se no solo e estas correspondem a 33,6% das sequências disponíveis no banco de dados. Segundo os autores, a grande diversidade ainda aguarda a descoberta, principalmente entre os anaeróbios fixadores de nitrogênio presentes no solo.

Em estudos realizados sobre a diversidade genética de bactérias associativas e endofíticas de trigo, 17 isolados foram obtidos a partir de uma pré-selecionada com meios de cultura específicos. Destes, todos apresentaram atividade da nitrogenase e produção de AIA, mas poucos foram eficientes quanto à solubilização de fosfato. O sequenciamento do gene ribossomal *16S* mostrou a presença de *Azospirillum zae*, *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas stutzeri* entre os isolados. Como garantia na identificação das espécies, o gene *dnaK* foi utilizado como referência. Este gene foi clonado e resultados semelhantes ao do *16S* rDNA foram obtidos. Através da análise do gene *nifH* os autores puderam verificar que a nitrogenase mostra um elevado grau de conservação quanto a estrutura, função e sequências de aminoácidos nestes organismos. A síntese de AIA pôde ser comprovada pela presença do gene *ipdC* em todos os isolados examinados (VENIERAKI et al., 2011).

Salamone et al. (2010) estudando a resposta da re-inoculação com *Azospirillum brasilense* isoladas de milho na cultura do arroz através de respostas eco-fisiológicas

(FBN e biomassa) e estudo populacional, utilizaram a técnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) para a caracterização dos isolados. Como resultados obtidos, os autores citam a presença da estirpe inoculada no interior dos tecidos, além de outras estirpes de *Azospirillum* incluindo *Azospirillum oryze*. Os dados permitiram a formação de dois grupos rizobacterianos distintos: o primeiro gerado a partir de bactérias diazotróficas obtidas exclusivamente das sementes e o outro representando um grupo de diazotróficos obtidos a partir de raízes e parte aérea.

Em cana-de açúcar, a presença de uma grande diversidade endofítica na cultura, distribuídos em diversos gêneros como, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Xanthomonas*, *Comamonas*, *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Microbacterium* e *Kokuria* foram observados em estudos da diversidade genética de bactérias endofíticas na seiva apoplástica do parênquima medular da haste das plantas cultivadas em solos agrícolas (VELÁZQUEZ et al., 2008). Os autores utilizaram o TP-RAPD (Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA) e, dentre os 29 isolados morfológicamente distintos, 17 padrões diferentes foram obtidos por esta técnica.

Castro-González et al. (2011) relataram sobre a diversidade de espécies cultiváveis de *Burkholderias* capazes de desenvolver associação com cana-de-açúcar. Utilizando tecidos de raízes jovens, haste do vegetal e solos da rizosfera, os autores aplicaram testes moleculares (ARDRA) e amplificação do gene *nifH*. Para confirmar os resultados, testes fisiológicos e bioquímicos foram aplicados. Como resultados, os autores constataram a presença de *B. caribensis* e *B. vietnamienses* como ótimas solubilizadoras de fosfato, na produção de sideróforos e como sintetizadoras de AIA promovendo o crescimento vegetal das plantas. Tais estudos permitiram a identificação de uma ampla distribuição ambiental e geográfica destas espécies na cultura da cana-de-açúcar.

Brasil et al. (2005), avaliando a comunidade bacteriana da região Pantanal (MS) em três diferentes forrageiras (*Elyonurus muticus*, *Axonopus purpusii* e *Brachiaria humidicola*), observaram a presença de *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia* spp., destacando-se entre elas, maior proporção de *Azospirillum* associadas às três espécies. *Herbaspirillum* e *Burkholderia* não foram observadas no solo, e a maior comunidade de diazotróficos estava associada às raízes quando comparado às demais partes das plantas. Os autores constataram altos níveis da nitrogenase em raízes sugerindo que as bactérias diazotróficas endofíticas sejam as principais responsáveis pela FBN nestas forrageiras.

Silva (2010), caracterizando a biodiversidade de rizobactérias associadas à raízes de *Brachiaria brizantha*, pelo sequenciamento parcial do gene *16S* rDNA, observou a presença de *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Sphingomonas* sp. e *Azospirillum* sp.

Como a diversidade de rizobactérias varia em função de muitos fatores como fertilidade de solo, genótipo, fenologia da planta hospedeira e sistemas de manejo (RODRIGUES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006b), o conhecimento desta diversidade fenotípica e genética das populações presentes na rizosfera das plantas pode auxiliar na compreensão de como as variações no ambiente podem influenciar a funcionalidade destas populações.

## **2.6 Principais Métodos Empregados em Estudos de Diversidade Genética de Bactérias Endofíticas**

Até recentemente, para identificação de uma espécie bacteriana era necessário obter uma cultura pura e nesta identificação utilizavam-se características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A maior limitação destes procedimentos é o fato de que a grande maioria de bactérias não pode ser obtida como cultura pura. A diversidade de organismos cultiváveis não é bem avaliada, já que um grande número de meios de cultura e técnicas de cultura deve ser utilizado para avaliar a diversidade de um determinado nicho (MAGNANI, 2005). A utilização de técnicas moleculares permitem a identificação e reclassificação de um maior número de organismos em relação às demais técnicas, possibilitando, muitas vezes, a identificação de organismos não cultiváveis (KIRCHOFF et al., 1997).

Dentre as técnicas morfológicas usadas estão o estudo da morfologia das colônias, formação de cápsulas, estudo da motilidade, coloração de flagelos (YANNI et al., 1997; VALVERDE et al., 2003; PRAYITNO e ROLFE, 2010).

Nas técnicas fisiológicas e bioquímicas, citam-se a coloração de gram, caracterização das bactérias pelo sistema denominado como API (Appareils et Procédés d'Identification), examinando-se as características dos isolados e posteriormente comparando-os com o manual Bergey e a base de dados dos sistemas API (PRAYITNO e ROLFE, 2010). Além disso, testes fisiológicos como o de crescimento diferencial de bactérias em meios suplementadores (PRAYITNO e ROLFE, 2010) e o número mais provável (NMP) (SOARES et al., 2006) também são utilizados.

Como ensaios bioquímicos, citam-se: ensaio para produção de etileno (redução do acetileno) (RODRIGUES et al., 2006; BARUA et al., 2012); determinação da eficiência de FBN pela quantificação dos níveis de nitrogenase (MAGNANI et al., 2010); determinação da solubilização de fosfato (ROJAS-TAPIAS et al., 2012); determinação da solubilização de sideróforos (ROJAS-TAPIAS et al., 2012); produção de AIA (KHALID et al., 2004; SOARES et al., 2006); atividade de peroxidases (SHARMA et al., 2007) e a formação de biofilmes (ANDREOTE et al., 2009; TANG et al., 2010).

Um aspecto negativo da utilização exclusiva das técnicas bioquímicas e fisiológicas é que a grande diversidade de bactérias, nas diferentes amostras coletadas no ambiente, não pode ser representada pela cultura em placas. Isto ocorre pelo fato de que, a maioria das estirpes não cresce em meio de cultura padrão (TYSON e BANFIELD, 2005). Estes meios não representariam o habitat bacteriano natural, acessando apenas parte de toda a comunidade microbiana (ANDREOTE et al., 2009).

Nos últimos anos, os estudos de diversidade endofítica bacteriana de uma extensa variedade de plantas têm sido realizados utilizando principalmente técnicas de tipagem genética. Recentemente, Mocali et al. (2003) pesquisaram a diversidade endofítica em *Ulmus* spp. utilizando as técnicas de seqüenciamento do gene rRNA *16S* e ARDRA, encontrando representantes dos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Enterobacter* e *Staphylococcus*. Em três variedades diferentes de batata (*Solanum tuberosum*) foram encontrados representantes das subdivisões alfa, beta e gama-proteobactéria (BERG et al., 2004; SESSITSCH et al., 2002). Técnicas de biologia molecular permitiram a descrição de endofíticos em: soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004), plantas cítricas (ARAUJO et al., 2002), arroz (CHAINTREUIL et al., 2000; VERMA et al., 2001), trigo (CONN e FRANCO, 2004), cana-de-açúcar (VELÁZQUEZ et al., 2008; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011) e forrageiras (BRASIL et al., 2005; SILVA, 2010).

A maioria dos métodos moleculares que vêm sendo empregados para a caracterização de isolados, linhagens e estirpes, tem como base a análise com PCR (denominadas genericamente como *PCR-based DNA fingerprinting techniques*). Até o presente momento, o maior número de trabalhos relata o uso de análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), polimorfismo dos espaçadores (IGS – intergene sequences) do DNA ribossômico, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature

Gradient Gel Electrophoresis), PCR–SSCP (Single–Strand–Conformation Polymorphism), PCR de seqüências repetitivas de DNA (rep–PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP–PCR) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999).

Na década de 1980 e início da década de 1990, o emprego de técnicas de biologia molecular resultou em uma verdadeira revolução na taxonomia das bactérias e fungos. Nessa época, alguns estudos passaram a ser conduzidos com os genes RNA ribossomais (RNAr) e resultados coerentes obtidos pela análise desses genes resultaram na escolha preferencial dos mesmos para estimar tanto relações filogenéticas, como a posição taxonômica de micro-organismos (WOESE, 1987; WOESE et al., 1990; WEISBURG et al., 1991; BRIDGE et al., 1998; GARRITY et al., 2001; McCARTNEY et al., 2003; ATKINS e CLARK, 2004). Como as análises em geral são feitas com DNA e não com RNA, também é usual se referir a elas como DNAr.

Os genes ribossomais apresentam uma série de características favoráveis a sua utilização em filogenia: *i*) são encontrados em todos os organismos vivos, uma vez que a síntese de proteínas ribossomais é obrigatória; *ii*) expressam estruturas secundárias altamente conservadas, que são importantes para o alinhamento correto das seqüências destes genes; *iii*) são componentes principais da estrutura dos ribossomos e, portanto, abundantes nas células, facilitando a sua identificação; *iv*) diferenças nas seqüências desses genes evoluem em taxas diferentes, permitindo que análises filogenéticas sejam realizadas em vários níveis de resolução taxonômica (WOESE et al., 1990; VANDAMME et al., 1996; GARRITY et al., 2001).

Nos primeiros estudos com os genes ribossomais, utilizava-se o sequenciamento parcial dos genes (YOUNG et al., 1991) ou, então, uma combinação de métodos, como o PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) dos genes ribossomais, que consiste na amplificação por PCR das regiões do DNA que codificam os genes ribossomais (ou o espaço intergênico), seguida pelo corte com enzimas de restrição e eletroforese dos fragmentos amplificados (ALBERTON et al., 2006; GERMANO et al., 2006; KASCHUK et al., 2006; PINTO et al., 2007). Contudo, com as facilidades e redução no custo do sequenciamento, esse é hoje o método de preferência (MENNA et al., 2006, 2009a; BINDE et al., 2009).

Para a identificação taxonômica ou das relações filogenéticas de uma determinada estirpe de bactéria, a seqüência do gene ribossomal *16S* em estudo pode ser comparada por

similaridade com sequências ribossomais das estirpes tipo “*type strain*” (ou de referência) das espécies bacterianas depositadas em bancos de dados (como o GenBank do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - e o RDP - *Ribosomal Database Project*, em <http://rdp.cme.msu.edu>). Alternativamente, podem-se construir árvores filogenéticas onde a sequência do gene ribossomal *16S* da bactéria em estudo é analisada em conjunto com sequências ribossomais de estirpes tipo e/ou de referência das espécies bacterianas representativas do estudo (GRANGE et al., 2007).

É importante mencionar, também, outra metodologia mais recente que vem sendo cada vez mais empregada, o MLST (*Multi-locus Sequence Typing*, tipagem por sequenciamento de lócus múltiplos), a qual consiste no sequenciamento e análise conjunta (como uma única sequência concatenada) de vários genes *housekeeping*, em geral cinco (McCARTNEY et al., 2003; BAIN et al., 2007; WOO et al., 2007). De acordo com Zeigler (2003), os genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer alguns critérios: *i*) distribuição no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100 kb; *ii*) presença no genoma em uma única cópia; *iii*) extensão nucleotídica suficiente que permita o sequenciamento; *iv*) conter informações suficientes para as análises; e *v*) que os dados obtidos com o uso destes genes sejam correlacionados com os dados obtidos com o gene ribossomal *16S* e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridização DNA-DNA. O MLST visa, basicamente, a caracterização genotípica em nível intraespecífico (GEVERS et al., 2005) e foi, inicialmente, desenvolvido e utilizado em estudos de diversidade e identificação em bactérias patogênicas ao homem (ENRIGHT et al., 1999), mas passou a ser utilizado também para a identificação de patógenos de plantas, inclusive fungos (McCARTNEY et al., 2003; BAIN et al., 2007).

Aplicando o mesmo princípio do MLST à taxonomia e filogenia, foi então desenvolvida a metodologia de *Multi-locus Sequence Analysis* (MLSA) (STACKEBRANDT et al., 2002; STEPKOWSKI et al., 2003), com propósitos específicos que permitem a sua utilização para a definição de espécies e elucidar relações taxonômicas entre espécies bacterianas (GEVERS et al., 2005; MARTENS et al., 2007; MENNA et al., 2009a; RIBEIRO et al., 2009) e espécies de fungos (WOO et al., 2007).

O RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*: DNA polimórfico amplificado ao acaso) utiliza como iniciadores *primers* únicos de sequências curtas (10 bases), os quais

reconhecem regiões no genoma contendo sequências nucleotídicas curtas, repetidas e invertidas. Os produtos de amplificação por RAPD são submetidos à eletroforese em gel de agarose. Essa técnica pode ser aplicada a qualquer espécie, pois não há necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para construção dos *primers* (FALEIRO, 2007). Em geral, o RAPD tem sido mais amplamente utilizado em nível intraespecífico, como por exemplo, na identificação de grupos de linhagens patogênicas, produtoras de toxinas, entre outros (BRIDGE et al., 1998). Esta técnica apresenta como principais vantagens a facilidade e rapidez para obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e a universalização das análises (FALEIRO, 2007). Uma desvantagem que com frequência é atribuída a esse método, reside na baixa reprodutibilidade nos perfis de bandas obtidos (BRADSHAW et al., 2006).

O AFLP (*A*mplified *F*ragment *L*ength *P*olymorphism- polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) envolve a ligação de adaptadores às extremidades de fragmentos de DNA clivados com enzimas de restrição, os quais fornecem sítios de anelamento de *primers* com alta estringência para as amplificações por PCR (BRADSHAW et al., 2006). Os produtos de amplificação por PCR são submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida e geram um grande número de fragmentos, os quais são resolvidos em um único gel (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995). A presença de um grande número de polimorfismo por reação e o fato de não haver a necessidade de se ter conhecimento prévio das sequências de DNA para construção dos primers, são as principais vantagens do método (FALEIRO et al., 2001). Apesar do AFLP ser uma técnica mais robusta que o RAPD, é tecnicamente mais trabalhosa e, por isso, tem sido pouco utilizado na identificação de linhagens para fins de diagnóstico (BRADSHAW et al., 2006).

Uma das aplicações dos marcadores RAPD e AFLP é a identificação de bandas polimórficas (denominadas SCARs, *S*equences *C*haracterized *A*mplified *R*egions), as quais são clonadas, sequenciadas e utilizadas no desenvolvimento de marcadores espécie-específicos e/ou linhagem-específicos (McCARTNEY et al., 2003; BRADSHAW et al., 2006).

O método referido como *rep*-PCR (repetitive extragenic palindromic sequence) é uma técnica baseada na amplificação do DNA e é tida como uma técnica extremamente confiável, reprodutível, rápida e altamente discriminatória (VERSALOVIC et al., 1994; LOUWS et al., 1998). Os marcadores *rep*-PCR foram, originalmente, desenvolvidos para o

estudo de diversidade e identificação de bactérias (de BRUIJN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994). Esta “impressão digital” do genoma faz uso de primers de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservado, com sequências repetitivas de DNA, presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias gram negativas e em muitas gram positivas (MAHUKA et al., 2006). Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações e supõe-se que, por serem associadas a graus elevados de polimorfismo, essas regiões gênicas tenham uma participação em processos de evolução adaptativa, mediando a interação dos micro-organismos com ambientes hostis (VAN BERKUM, 1999).

Existem três famílias principais de elementos, incluindo as sequências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e elementos BOX, para as quais foram desenvolvidos e otimizados primers (de BRUIJN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994), que vêm sendo amplamente utilizados desde então. As identidades genômicas geradas pelas técnicas de rep-PCR permitem a diferenciação em nível de espécies, sub espécies e cepa (RADEMAKER e DE BRUJIN et al., 2000; BRADSHAW et al., 2006; MENNA et al., 2009b). Estes primers, também têm sido utilizados em fungos para a identificação de linhagens, permitindo a diferenciação de isolados intimamente relacionados de uma mesma espécie (BRIDGE et al., 1998; MORTON et al., 2003; ATKINS e CLARK, 2004).

A caracterização de *Rhizobium* sp. por rep-PCR tem sido vastamente documentada (FERNANDES et al., 2003; HUNGRIA et al., 2006, 2008; ALBERTON et al., 2006; KASCHUK et al., 2006; BARCELLOS et al., 2007; PINTO et al., 2007; STOCCO et al., 2008; BINDE et al., 2009; MENNA et al., 2009b). Em função da facilidade, alta reprodutibilidade e baixo custo da análise, a caracterização por BOX-PCR foi, recentemente, definida como método oficial do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para a caracterização de estirpes de rizóbios autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil (HUNGRIA et al., 2008).

Além da utilização desta técnica em leguminosas, nas não leguminosas a utilização de rep-PCR também apresenta grande importância em estudos de diversidade genética de bactérias. São exemplos do uso desta ferramenta: Pereira et al. (2012) trabalhando com endofíticos em morangos; Islam et al., (2012) em estudos de diversidade genética de

bactérias fixadoras de N de vida livre em campos de arroz e Yang et al. (2008) em estudos de diversidade genética de bactérias antagonistas associadas ao arroz.

A interação de bactérias diazotróficas com diversas culturas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção, ao reduzir o uso de adubos nitrogenados, e conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais (MOREIRA et al., 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização das Áreas de Coleta de Solos

As coletas de solo foram realizadas nas regiões extremo Oeste do estado do Paraná no entorno do município de Palotina, Centro Oeste nas mediações das cidades de Goioerê e Moreira Sales, como também na região Noroeste do estado, próximo à cidade de Mariluz (FIGURA 1).

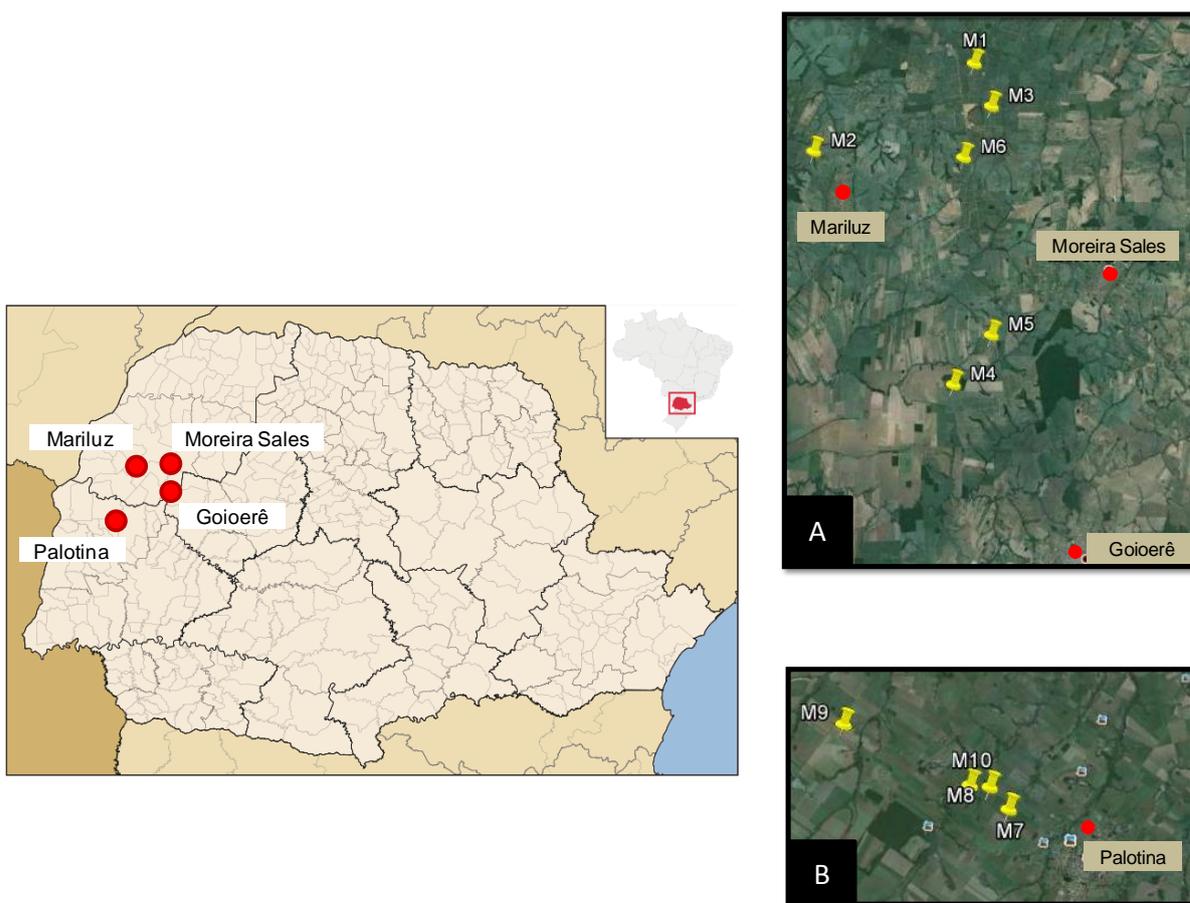


Figura 1. Localização dos pontos de coleta no mapa do Estado do Paraná. A – Pontos de coleta das sub-amostras das regiões Noroeste (M2) e Centro Oeste (M1, M3, M4, M5, M6); B – Pontos de coleta das sub amostras da região extremo Oeste (M7, M8, M9, M10).

Para a coleta dos solos, selecionou-se 10 diferentes áreas (também denominadas de glebas), cada qual composta por um manejo diferente, e este, representado pela letra “M”. Dentre os diferentes manejos, nove correspondem a áreas agricultáveis e um representando a área de mata ciliar (TABELA 1).

As diferentes áreas de coleta também foram caracterizadas quanto à classe de solo que as compõe. Baseado na classificação de solos estabelecida por Bhering e Santos

(2008), verificou-se a presença de cinco diferentes tipos de solos, sendo estes: ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico (PVe 2), ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico (PVe 1), LATOSSOLO VERMELHO Distrófico (LVd19), LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef 1) e NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico (NVef 8). Estes foram enumerados de 1 a 5 e representados pela letra “S” (TABELA 1).

Quanto à textura do solo e diâmetro de partículas, os solos classificados como ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico (PVe 2; PVe 1) e LATOSSOLO VERMELHO Distrófico (LVd 19) caracterizam-se como de textura arenosa/média e, portanto, apresentam partículas com diâmetro entre 0,05 mm e 0,42 mm. Os solos classificados como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (LVef 1) e NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico (NVef 8) são solos de textura argilosa, apresentando partículas com diâmetro inferior a 0,005 mm (BHERING e SANTOS, 2008).

Segundo a Embrapa (2006), o sistema brasileiro de classificação de solos aponta as seguintes características quanto aos tipos de solos existentes nas diferentes regiões de coleta: 1. Latossolos - São os solos predominantes no Brasil e, em geral, apresentam relevo suave, grande profundidade, alta permeabilidade e baixa capacidade de troca catiônica. Ocorre a predominância de óxidos de ferro, de alumínio e caulinita, que é uma argila de baixa atividade, sendo predominante na fração argila dos latossolos. Esta combinação química, juntamente com MO e alta permeabilidade e aeração conferem ao latossolo uma estrutura fina, muito estável que facilita o cultivo; 2. Argissolos ou podzólicos - São solos profundos e menos intemperizados do que os latossolos podendo apresentar maior fertilidade natural e potencial. A principal característica deste solo é a diferença textural entre os horizontes A e B, visto que no horizonte B concentra-se teor mais elevado de argila do que no horizonte A, onde, entretanto, a atividade biológica apresenta-se intensa. O acúmulo de argila no horizonte B torna os solos podzólicos menos permeáveis, portanto mais propensos à erosão hídrica; 3. Nitossolos - Representam uma nova classificação dentro dos argilosos também sendo considerados solos profundos, homogêneos, bem drenados, constituídos por material mineral, com horizonte B nítico. Este horizonte apresenta argila de atividade baixa, textura argilosa a muito argilosa, estrutura em blocos angulares ou subangulares, ou ainda, prismática moderada ou forte que, as vezes, apresentam superfícies brilhantes que podem ser interpretadas como cerosidade ou superfícies de compressão (FAO, 2001; EMBRAPA, 2006).

Tabela 1. Caracterização das áreas de coleta em relação ao tipo de manejo de cultivo, classe de solo e manejo deste, perímetro municipal e região do estado do Paraná onde estas foram coletadas.

	Manejo de cultivo	Classe de solo*	Sistema/Manejo de solo	Perímetro municipal	Região do estado do Paraná
<b>M1</b>	Monocultivo: cana-de-açúcar (Alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça)	<b>S1</b> PVe 2 <sup>1</sup>	Plantio convencional	Moreira Sales	Centro Oeste
<b>M2</b>	Monocultivo: cana-de-açúcar (Baixo teor de P no solo e adubação mineral)	<b>S1</b> PVe 2 <sup>1</sup>	Plantio convencional	Mariluz	Noroeste
<b>M3</b>	Cultivo de crotalária	<b>S1</b> PVe 2 <sup>1</sup>	Plantio direto	Moreira Sales	Centro Oeste
<b>M4</b>	Mata Ciliar	<b>S2</b> PVe 1 <sup>2</sup>	---	Goioerê	Centro Oeste
<b>M5</b>	Pousio precedido de: Cana - milho - soja	<b>S3</b> LVd 19 <sup>3</sup>	Plantio direto	Moreira Sales	Centro Oeste
<b>M6</b>	Rotação: Cana - soja - milho - cana	<b>S1</b> PVe 2 <sup>1</sup>	Plantio direto	Moreira Sales	Centro Oeste
<b>M7</b>	Sucessão: Milho - trigo	<b>S4</b> LVef1 <sup>4</sup>	Plantio direto	Palotina	extremo Oeste
<b>M8</b>	Sucessão: Milho - soja RR	<b>S4</b> LVef1 <sup>4</sup>	Plantio direto	Palotina	extremo Oeste
<b>M9</b>	Sucessão: Milho - soja	<b>S5</b> NVef8 <sup>5</sup>	Plantio convencional	Palotina	extremo Oeste
<b>M10</b>	Sucessão: Milho - soja orgânico	<b>S4</b> LVef1 <sup>4</sup>	Plantio direto	Palotina	extremo Oeste

\*Fonte: Bhering e Santos (2008).<sup>1</sup>ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico abruptico, textura arenosa/média, A moderado, fase floresta tropical subperenifólia, relevo ondulado; <sup>2</sup>ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico típico, textura arenosa/média, A moderado, fase floresta tropical subperenifólia, relevo suave ondulado; <sup>3</sup>LATOSSOLO VERMELHO Distrófico típico, textura média, A moderado, fase floresta tropical subperenifólia, relevo suave ondulado e plano; <sup>4</sup>LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico típico, textura argilosa, A moderado, fase floresta tropical perenifólia relevo suave ondulado; <sup>5</sup>NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico latossólico, textura argilosa, A moderado, fase floresta tropical perenifólia, relevo suave ondulado.

### 3.2 Coleta de Solos

Os solos foram coletados com auxílio de um trado holandês em uma profundidade aproximada entre 10 e 20 cm (região do solo com maior influência do sistema radicular das plantas). Primeiramente, cada área de coleta (gleba) foi dividida em 5 transeptos paralelos, denominados como transepto A, B, C, D e E, traçados na diagonal de acordo com o declive e direção do curso de água, homogeneidade do terreno, fertilidade do solo, derivação de agroquímicos, entre outros. Levou-se em consideração também, o efeito bordadura, desconsiderando-se, portanto, uma borda de aproximadamente 50 metros na transição entre lavoura - mata ciliar e mata ciliar - rio. O transepto mais distante do leito de água, neste caso o transepto E, foi desconsiderado a fim de manter maior homogeneidade dentro da área (FIGURA 2).

Os transeptos passaram a ser denominados de repetição (repetição 1, 2, 3 e 4) e estes constituídos por 5 sub-amostras cada. As sub-amostras foram coletadas a partir de uma linha imaginária em “zigue-zague” sobre o transepto, permitindo assim, a homogeneidade dentro da repetição. O transepto central (transepto C), destacado por ser o maior transepto quanto ao comprimento, foi constituído por 10 sub-amostras, com objetivo de favorecer a homogeneidade dentro desta repetição. Após a coleta das 5 sub-amostras por repetição, estas foram homogeneizadas e uma amostra deste solo homogeneizado foi separado, devidamente etiquetado e mantido em gelo durante a coleta (BUCKLAND et al., 2001). Os pontos de coleta das sub-amostras por repetição dentro de cada tipo de manejo foram obtidos por *Global Positioning System* (GPS) (TABELA 2).

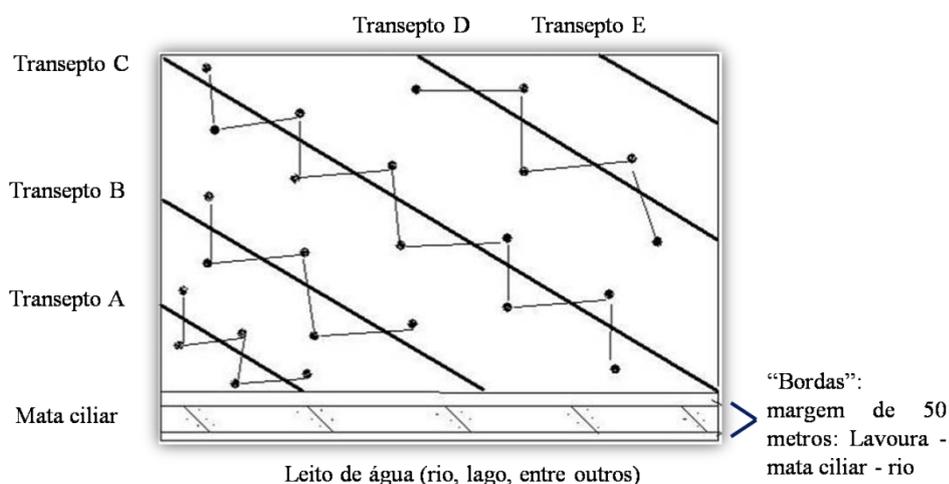


Figura 2. Distribuição estatística dos pontos de coleta de solo referentes às sub-amostras por repetição em relação à gleba (tipo de manejo), utilizados para obtenção dos isolados.

Tabela 2. Pontos de coleta das sub-amostras por repetição de acordo com cada tipo de manejo, obtidas por Global Positioning System (GPS).

Manejo de Cultivo	Sub amostras ou repetições			
	R1	R2	R3	R4
(M1) Moreira Sales	S 23° 57' 05"	S 23° 57' 05,2"	S 23° 57' 05,2"	S 23° 57' 05,9"
	W 053° 04' 47,7	W 053° 04' 46,3	W 053° 04' 43,7	W 053° 04' 40,9
(M2) Mariluz	S 23° 59' 33,9"	S 23° 59' 34,5"	S 23° 59' 33,1"	S 23° 59' 32,3"
	W 053° 09' 54,0	W 053° 09' 55,8	W 053° 09' 56,7	W 053° 09' 54,6
(M3) Moreira Sales	S 23° 58' 15,2"	S 23° 58' 14,8"	S 23° 58' 14,8"	S 23° 58' 15,5"
	W 053° 04' 44,0	W 053° 04' 44,3	W 053° 04' 44,1	W 053° 04' 44,2
(M4) Goioerê	S 23° 59' 45,3"	S 23° 59' 44,8"	S 23° 59' 44,4"	S 23° 59' 42,5"
	W 053° 05' 07,5	W 053° 05' 08,1	W 053° 05' 06,5	W 053° 05' 06,4
(M5) Moreira Sales	S 24° 04' 55,8"	S 24° 04' 55,9"	S 24° 04' 56,0"	S 24° 04' 56,6"
	W 053° 04' 14,9	W 053° 04' 16,5	W 053° 04' 18,0	W 053° 04' 17,4
(M6) Moreira Sales	S 24° 06' 22,4"	S 24° 06' 22,4"	S 24° 06' 22,2"	S 24° 06' 22,5"
	W 053° 05' 27,4	W 053° 05' 29,5	W 053° 05' 31,5	W 053° 05' 32,7
(M7) Palotina	S 24° 12' 52,6"	S 24° 12' 54,1"	S 24° 12' 53,9"	S 24° 12' 54,9"
	W 053° 54' 05,2	W 053° 54' 04,6	W 053° 54' 02,3	W 053° 54' 03,9
(M8) Palotina	S 24° 12' 46,1"	S 24° 12' 44,2"	S 24° 12' 44,5"	S 24° 12' 42,8"
	W 053° 53' 59,3	W 053° 53' 59,7	W 053° 54' 00,8	W 053° 54' 01,4
(M9) Palotina	S 24° 17' 14,3"	S 24° 17' 13,3"	S 24° 17' 12,9"	S 24° 17' 14,1"
	W 053° 52' 30,6	W 053° 52' 30,5	W 053° 52' 29,1	W 053° 52' 28,3
(M10) Palotina	S 24° 17' 18,1"	S 24° 17' 18,5"	S 24° 17' 17,6"	S 24° 17' 16,9"
	W 053° 53' 48,4	W 053° 53' 49,4	W 053° 53' 49,9	W 053° 53' 48,1

### 3.3 Isolamento das Estirpes de Endofíticos

Foram utilizados como planta isca, sementes de trigo da variedade BRS Pardela na captura de endofíticos (BASSOI et al., 2008; BASSOI et al., 2010). Para isso, as sementes foram esterilizadas com álcool (95%) e hipoclorito de sódio (10%) (3 minutos cada) e lavadas por 3 vezes com água destilada estéril. As sementes foram colocadas para germinar em papel germinativo (tipo Germiteste) umedecido em água destilada estéril, enroladas dentro de sacos plásticos semi-fechados para evitar ressecamento e incubadas durante 48 horas a 22 °C, no escuro (ANDRADE e HAMAKAWA, 1994).

Para o cultivo e inoculação das plântulas, foram preparados e utilizados sacos plásticos de polipropileno com espessura em torno de 0,12 mm e com dimensões médias de base e altura de 130 x 140 mm capazes de suportarem a autoclavagem. Para a montagem destes sacos plásticos foi necessário colocar, no interior do saco, um papel germinativo com comprimento e largura de 230 x 120 mm dobrado e perfurado para abrigar as sementes pré-germinadas. Os sacos plásticos contendo o papel Germiteste e 200 mL de solução nutritiva foram colocados em um suporte e esterilizados por autoclave

durante 20 minutos a 121°C, seguido da atribuição das sementes pré-germinadas aos saquinhos (CAMPO e HUNGRIA, 2007). Esta solução foi preparada a partir de uma solução estoque sem N mineral e contendo, por litro: 147,05 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 68,05 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,67 g de Fe-EDTA; 61,65 g de MgSO<sub>4</sub>; 43,50 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,169 g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,124 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,144 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,050 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,028 g de CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,0553 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (BROUGHTON e DILLWORTH, 1971). Foi utilizado 1 mL de cada solução estoque por litro de solução final e o pH foi ajustado para 6,6-6,8 com NaOH.

Para inoculação do solo nas plantas iscas, amostras de 10 gramas de solo de cada transepto por propriedade foram diluídas em 90 mL de solução salina 0,85% em frascos contendo pérolas de vidro. Estas foram mantidas em agitador mecânico horizontal por 30 minutos. Destas, 1 mL foi transferida para um novo frasco contendo 9 mL de solução salina 0,85% proporcionando a diluição de 10<sup>-2</sup>, segundo Vincent (1970). Em seguida, 1 mL da maior diluição foi aplicado em cada planta-isca as quais foram mantidas em casa de vegetação, dispostas em um delineamento inteiramente casualizado, durante um período de 30 dias.

Após este período, as plantas inteiras foram medidas e a variação no tamanho destas foi verificado através da análise de variância (ANOVA), pelo programa SISVAR. Estas plantas foram superficialmente esterilizadas com hipoclorito comercial a 50%, seguido de imersão em etanol 70% e lavadas três vezes em água destilada (ANDRADE e HAMAKAWA, 1994). Em câmara de fluxo laminar, as plântulas inteiras foram maceradas com solução salina 0,85%, diluídas até 10<sup>-3</sup>. De cada diluição seriada, foram plaqueados 100 µL em meio de cultura sólido Dygs (BALDANI, 2007) com pH ajustado para 6,5. As placas inoculadas foram mantidas a 27°C por aproximadamente 60 horas para obtenção de colônias puras. Conforme descrito por Baldani (2007), este meio foi composto por 2,0 g de glicose, 2,0 g de ácido málico, 1,5 g de peptona bacteriológica, 2,0 g de extrato de levedura, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, acrescidos de 1,5 g de ácido glutâmico e seu volume ajustado para 1 litro. Utilizou-se 13g de ágar bacteriológico. O meio foi esterilizado por autoclavagem.

A técnica de isolamento de estirpes bacterianas a partir de plantas iscas crescidas em sacos plásticos é uma técnica nova, publicada pela XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) no ano de 2007. O uso desta técnica para o

isolamento de bactérias endofíticas a partir de plantas não leguminosas foi um procedimento inédito.

O preparo dos sacos plásticos para plantio das sementes pré-germinadas, juntamente com a esterilização das sementes, sua pré-germinação, preparo do meio de cultivo, solução nutritiva e isolamento das estirpes a partir das plantas-iscas foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa - Soja). Além dos testes laboratoriais, a condução e manutenção das plantas-iscas em casa de vegetação também foram desenvolvidas na Embrapa - Soja, localizada na cidade de Londrina, Paraná.

### 3.4 Quantificação e Caracterização Morfológica das Colônias

O crescimento bacteriano foi quantificado pelo método de contagem do número de células viáveis presentes em uma suspensão, denominado de Unidades Formadoras de Colônias (u. f. c.), sendo a sigla equivalente em inglês Colony Forming Units (c. f. u.). Os métodos de contagem de colônias em placas ancoram-se no princípio que, sendo a diluição e o semeio em placas bem feitos, cada colônia surgida é considerada originária de uma única célula viável (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994).

Devido ao alto crescimento bacteriano verificado, utilizou-se um quadrante com área equivalente a 9 cm<sup>2</sup> na região central da placa a qual serviu de referência para a contagem das colônias viáveis (FIGURA 3). Após a contagem de u. f. c. por placa, calculou-se a média de colônias bacterianas viáveis em uma suspensão para cada manejo.

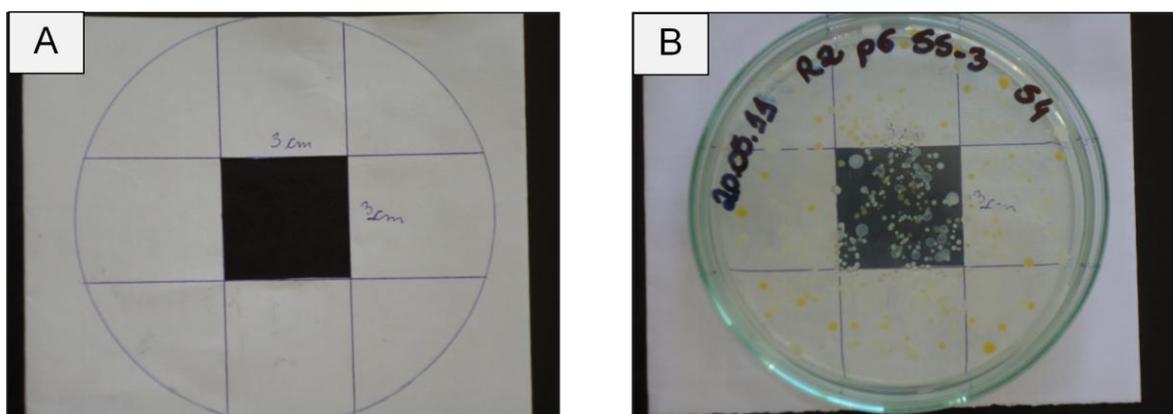


Figura 3. Quantificação do crescimento bacteriano pelo método de contagem do número de células viáveis presentes em uma suspensão (unidades formadoras de colônias - u. f. c.). A – Molde do quadrante central utilizado para quantificação de u.f.c por placa. B – Utilização do quadrante central no processo de quantificação de colônias viáveis presentes em uma suspensão.

As colônias bacterianas foram caracterizadas morfológicamente de acordo com o protocolo estabelecido por Fonseca et al. (2000). Os aspectos considerados pelo autor são: tamanho, forma, borda, homogeneidade, cor, transparência, elevação, muco e elasticidade. Estas são divididas em categorias: tamanho (>2 mm, 1-2mm, puntiforme), forma (circular ou irregular), borda (lisa ou ondulada), homogeneidade (homogênea ou heterogênea), cor (amarelo, amarelo claro, amarelo esverdeado, amarelo forte, creme e branco), transparência (transparente ou opaca), elevação (presença ou ausência), muco (pouco, médio e muito) e elasticidade (pouca, média e muita). O único aspecto que não foi abordado neste resultado foi a elasticidade. Os isolados considerados morfológicamente diferentes entre si foram repicados para novas placas de Petri contendo meio de cultura Dygs, para obtenção de culturas puras.

Após a purificação das colônias, estas foram mantidas em meio sólido, porém alíquotas foram armazenadas em meio de cultivo Dygs contendo 30% glicerol. Estas foram mantidas a -20 °C a fim de preservá-las a médio/longo prazo. Este procedimento tende a manter a estirpe com vida, sem contaminações e preservar suas características originais, evitando alterações na célula provocadas pela influência do ambiente (BALLATI, 1992). Segundo Campos et al. (2004), o glicerol impede a difusão da água no interior das células e reduz a formação de cristais de gelo, além de estabilizar alguns componentes da membrana celular, impedindo alterações celulares.

A manutenção e preservação dos isolados em placas de Petri como também sua armazenagem em glicerol, foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Genética – LABIOGEN e Laboratório de Biotecnologia – LABIOTEC, localizados na Universidade Federal do Paraná – UFPR campus Palotina, na cidade de Palotina, Paraná.

#### 3.4.1 Análise de Agrupamento dos Isolados Selecionados com Base em suas Características Morfológicas

Primeiramente, foram realizadas análises de correlação entre as características morfológicas e tipo de manejo, solo ou região. Estas análises foram obtidas com base no programa Statistica 5.0 (STATSOFT, 1995), onde se utilizou o cálculo do coeficiente de Spearman, uma das mais antigas medidas de relacionamento de duas variáveis, já que os dados de morfologia são considerados não-paramétricos (PONTES, 2005).

O agrupamento dos isolados quanto às características morfológicas foi gerado a partir do programa Past (Paleontological Statistics) (HAMMER et al., 2001), pelo uso do algoritmo Ward e cálculo da Distância Euclidiana, com ponto de corte 0,3 no dendrograma. Este cálculo leva em consideração a distância entre os indivíduos, como, neste caso, as diferenças morfológicas entre eles.

### 3.4.2 Índices de Diversidade e Riqueza com Base nos Perfis Morfológicos

Foram calculados os índices de diversidade de Shannon e sua modificação, índice de diversidade de Simpson, a riqueza (ACE), bem como o número de espécies novas esperadas em uma coleta futura, usando o programa SPADE (“Species Prediction and Diversity Estimation”) (CHAO e SHEN, 2003). A riqueza genética das populações de cada manejo foi calculada com o índice ACE (“abundance-based coverage estimator”), uma estimativa não-paramétrica proposta por Chao e Lee (1992), na qual as espécies observadas são separadas em dois grupos: raros e abundantes. Nessa análise, somente os indivíduos do grupo raro são usados para estimar o número de indivíduos que estariam faltando na amostragem. A predição de novas espécies em um levantamento mais amplo foi estimada conforme recomendado por Shen et al. (2003).

O índice de Shannon-Weaver é um índice geral de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (ATLAS e BARTHA, 1998). Este índice foi calculado pelo uso da equação  $H' = -\sum_{t=1}^S (p_t \cdot \ln p_t)$  proposta por Shannon e Weaver (1949), onde  $H'$  é o índice de diversidade de Shannon,  $S$  é o número de espécies detectadas e  $p_t$  é a frequência de cada espécie (riqueza) com  $t$  variando de 1 a  $S$ . Ao fazer-se uso deste, é possível calcular o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com  $S$  espécies e  $N$  indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. Quanto maior o valor do índice maior tende a ser a diversidade (URAMOTO et al., 2005). Além disto, calculou-se também uma estimativa não-paramétrica do mesmo índice, sendo este baseado no método de cobertura de amostragem e espécies não observadas (CHAO e SHEN, 2003). A diferença entre esses parâmetros reside em que o índice tradicional de diversidade desconsidera as possíveis espécies que não foram observadas, enquanto que no método de Chao e Shen (2003) esses indivíduos são considerados com base nos grupos raros, que são aqueles que apresentam um número inferior ao corte (“cut-off”) do modelo.

O índice de Simpson é um índice de dominância que leva em consideração a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Levando em consideração que uma espécie é considerada dominante quando apresenta frequência superior a  $1/S$ , sendo  $S$  o número total de espécies na comunidade, quanto mais alto for o valor obtido pela equação de Simpson, maior a probabilidade dos indivíduos pertencerem a uma mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade (URAMOTO et al., 2005).

Enquanto o índice de riqueza considera apenas o número total de espécies encontradas na comunidade, os índices de diversidade levam em conta além da riqueza, a presença de dominância de uma determinada população na comunidade amostrada, resultando em uma melhor avaliação da distribuição das espécies dentro da comunidade. Além disso, o índice de Shannon atribui um maior peso as espécies raras, sendo que um maior número destas resulta em uma diminuição desse índice (MAGURRAN, 2004). Magurran (2004), ainda afirma que enquanto o índice de Shannon é o mais frequente nas publicações, o índice de Simpson seria o melhor indicado por sua robustez, melhor estabilidade quando a amostra é pequena e por considerar a abundância das espécies, ao invés de simplesmente a riqueza.

### **3.5 Caracterização Genética das Estirpes**

A caracterização genética das estirpes foi realizada por partes no Laboratório de Bioquímica e Genética – LABIOGEN e Laboratório de Biotecnologia – LABIOTEC, localizados na UFPR campus Palotina, na cidade de Palotina, Paraná, onde se desenvolveu a extração de DNA dos isolados, eletroforese e parte das reações BOX-PCR. A outra parte das reações BOX-PCR foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Solo (Embrapa-soja).

#### **3.5.1 Extração de DNA**

A extração de DNA genômico foi realizada a partir das colônias puras, baseado no protocolo estabelecido por Hungria et al. (2008). As bactérias oriundas de colônias puras foram inoculadas em 15 mL de meio Dygs líquido com pH ajustado para 6,5, mantidas em agitador mecânico horizontal a 125 rpm e 27 °C por aproximadamente 16 horas. Após incubação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4

°C. Ao descartar o sobrenadante, o precipitado foi ressuspensionado e lavado 4 vezes com 1,5 mL de solução salina 0,85%. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a última lavagem, adicionou-se 0,5 mL de solução salina 0,85%, realizando a homogeneização e transferindo o volume para novos tubos de 1,5 mL. Centrifugou-se novamente as amostras a 12.000 rpm por 10 minutos, porém, a partir deste passo utilizou-se temperatura ambiente (22 °C). Ressuspendeu-se o precipitado em 400 µL de TE 50:20 (50 mmol L<sup>-1</sup> de Tris pH 8,0 e 20 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA Sal Dissódico pH 8,0), homogeneizando as amostras e logo adicionou-se em cada uma 50 µL de SDS a 10% (10g de Dodecil Sulfato de Sódio em 100 mL de água destilada autoclavada). Em seguida, foi pipetado 5 µL de proteinase K (25 mg mL<sup>-1</sup>), 3,5 µL de lisozima (20 mg mL<sup>-1</sup>) e 3 µL de RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>). Todas as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por uma hora e homogeneizadas com ponteiros de 1mL com as pontas cortadas em bisel para retirar a viscosidade. Em seguida, adicionou-se 30 µL de cloreto de sódio 5 M, 70 µL de acetato de sódio 3 M e 28 µL de água ultra pura. As amostras foram novamente homogeneizadas, mantidas em geladeira por 1 hora e novamente centrifugadas (12.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente). Do sobrenadante de cada amostra, 300 µL foram transferidos para novos tubos onde foram adicionados 600 µL de etanol puro (99%) gelado. Todas as amostras foram então armazenadas a -20 °C, onde permaneceram durante uma noite.

No dia seguinte, as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e 700 µL de etanol 70% a temperatura ambiente foram acrescentados para lavagem do pellet e retirada do excesso de sais. Para finalizar, realizou-se centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos (temperatura ambiente), descartou-se o sobrenadante e os precipitados foram secados em temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas. Após este período, as amostras foram ressuspensionadas em 50 µL de TE 10:1 (10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8; 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8,0).

A quantificação do DNA de cada amostra foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda 260 nm, sendo que 1 unidade de absorbância corresponde a 50 µg mL<sup>-1</sup> de DNA. A leitura foi feita com as amostras diluídas e a concentração do DNA (µg mL<sup>-1</sup>) foi dada pela seguinte relação: (OD<sub>260</sub> x Fator de diluição x 50 µg mL<sup>-1</sup>)/1000. Para verificar a pureza do DNA foi feita, também, a leitura a 280 nm. Com a relação entre as leituras 260/280 foi obtida a pureza do DNA (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>), que deve ser entre 1,8 e 2,0.

Depois das leituras, foi realizada a diluição do DNA para obter um estoque de DNA concentrado e outro de DNA diluído (utilizado para amplificação).

Para verificar a concentração e pureza do DNA, as amostras (diluídas) foram corridas em gel de agarose a 1,5% [0,975g de agarose em 65 mL de TBE 1X (10,8 mL de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0)], durante 2 horas e 40 minutos a 60 V. Os géis foram corados com brometo de etídio ( $1\text{mg mL}^{-1}$  de estoque, 0,00005% de concentração final) por aproximadamente 15 minutos e a visualização feita em transiluminador emitindo luz ultra-violeta de comprimento de onda curta.

### 3.5.2 Amplificação do DNA pela Reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o “primer” Específico BOX A1R (*rep*-PCR)

A caracterização genética foi realizada através da amplificação por PCR, usando o “primer” específico BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Invitrogen<sup>TM</sup>). A reação foi realizada de acordo com as condições descritas por Fernandes et al. (2003) e Kaschuk et al. (2006): 13,3  $\mu\text{L}$  de água ultra pura; 5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (1,5 mM de cada base); 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão PCR 10x; 1  $\mu\text{L}$  de “primer” 50 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ; 1  $\mu\text{L}$  de DNA 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ; 0,7  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase 5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ , com um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . Para amplificação, utilizou-se o programa descrito por Versalovic et al. (1994) com as modificações especificadas por Hungria et al. (2008): 1 ciclo a 95 °C por 7 minutos para desnaturação inicial; 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto (desnaturação), a 53 °C por 1 minuto (anelamento) e a 65 °C por 8 minutos (extensão); seguido de 1 ciclo de extensão final a 65 °C por 16 minutos; mantendo-se a 4 °C.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 120 V por aproximadamente 6 horas, em um gel de agarose de 20 x 25 cm a 1,5%, diluído em tampão TBE 1X pH 8,0. Nas canaletas do gel foram aplicados 25  $\mu\text{L}$  de cada amostra adicionados a 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra por tubo (tampão de amostra preparado com 0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose), com exceção da primeira canaleta, da central e da última, nas quais foi aplicado 7  $\mu\text{L}$  (por canaleta) do padrão de peso molecular de 1kb (plus DNA Ladder<sup>TM</sup>- Gibco- Life technologies). Os géis foram corados com brometo de etídio, conforme descrito no item anterior, e fotografados para posterior análise dos resultados pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01).

### 3.5.3 Análise de Agrupamento dos Produtos Obtidos na Análise de *rep*-PCR

Os produtos de PCR obtidos e fotografados, conforme descrito no item 3.5.2, foram analisadas pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01). Para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) e o coeficiente de Jaccard. Foram considerados semelhantes os perfis com 60% de similaridade nos dendrogramas, levando em consideração uma tolerância de 3%.

### 3.5.4 Índices de Diversidade e Riqueza Obtidos para as Populações de Endofíticos com Base na Análise de *rep*-PCR

Para o estudo de diversidade e riqueza genética dos isolados, como também o número de espécies novas esperadas em uma coleta futura, estes foram desenvolvidos de acordo com o descrito no item 3.4.2. Para estimar os índices de diversidade genética dos isolados obtidos da região oeste paranaense, os mesmos foram divididos segundo a procedência do manejo do solo. Para cada categoria foi verificado o número total de indivíduos e o número de perfis distintos de BOX-PCR.

Análises de correlação entre as características genéticas e tipo de manejo, solo ou região também foram inferidas, conforme descrito no item 3.4.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da Quantificação e Caracterização Morfológica dos Isolados

De acordo com a altura das plantas iscas, não se verificou diferença estatística entre os diferentes tipos de manejos. Porém, ao levarmos em consideração a quantificação realizada pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c) em uma suspensão, uma das técnicas mais básicas e essenciais em bacteriologia, destaca-se a área com sucessão milho-soja com plantio em sistema orgânico (M10), classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (S4), como sendo o manejo que favoreceu a maior média no número de isolados (332 u. f. c.). A segunda maior média refere-se ao manejo com sucessão milho-soja com plantio em sistema convencional (M9) e solo classificado como NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico (S5) (253 u.f.c), seguido pelo manejo M5 (área de pousio antecedido por rotação de culturas – cana-de-açúcar, milho, soja, em LATOSSOLO VERMELHO Distrófico (S3)) com média de 202 u. f. c. Em contrapartida, o manejo com sucessão milho-soja RR (M8) em solo classificado como LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (S4) destaca-se por apresentar a menor média de u. f. c. (99), seguido pelos manejos M3S1 e M7S4 com média de 105 e 109 u. f. c. respectivamente (TABELA 3).

Tabela 3. Média de unidades formadoras de colônias (u. f. c.), do número de colônias morfológicamente distintas e da altura das plantas de trigo após 30 dias de inoculação.

Manejo de cultura	Contagem de colônias (u. f. c.)*	Número de colônias diferentes*	Altura das plantas (cm)
M1	136	3	54
M2	184	3	54
M3	105	4	44
M4	186	4	57
M5	202	3	50
M6	176	2	49
M7	109	3	60
M8	99	3	57
M9	253	2	50
M10	332	2	54

\*Dados de variância, coeficiente de variação e erro padrão apresentados no ANEXO – C. M1 – Monocultivo de cana-de-açúcar (alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça); M2 – Monocultivo de cana-de-açúcar (baixo teor de P no solo e adubação mineral); M3 – Cultivo de crotalária; M4 – Mata ciliar; M5 – Pousio precedido de: cana – milho – soja; M6 – Rotação: Cana – soja – milho – cana; M7 – Sucessão milho – trigo; M8 – Sucessão milho – soja RR; M9 – Sucessão milho – soja; M10 – Sucessão milho – soja orgânico.

As mais altas médias de u. f. c. observadas nos manejo M9S5 e M10S4, ambos na região extremo Oeste do estado do Paraná sob solos classificados como de textura argilosa, podem ser justificadas, principalmente, por apresentarem solos de alta fertilidade e com histórico recente de exploração do recurso natural, onde provavelmente, a microbiota ainda se encontra em alta densidade populacional (RAMOS e FILHO, 2010). A relação entre o manejo do solo para estes dois cultivos também deve considerar que, enquanto a soja orgânica preserva a comunidade microbiana devido ao envolvimento de poucos tratamentos culturais, a soja convencional abrange, principalmente, o revolvimento do solo no preparo do plantio, o que permite melhor disponibilidade de nutrientes para os membros da microbiota (LOURENTE et al., 2011).

Shu et al. (2012) verificaram maior concentração de N e C em áreas com manejo orgânico quando comparado a áreas com manejo convencional (fertilização química), aumentando gradativamente a concentração destes componentes ao solo com o passar dos anos. Contudo, observaram uma grande relação da concentração de N e C do solo com o número de diazotróficos e, quanto maior a concentração destes compostos ao solo, maior foi o número de diazotróficos observados.

Conforme apontado por Assis Júnior et al. (2003), em estudos da atividade microbiana do solo em sistemas agroflorestais, monoculturas, mata natural e área desmatada, quanto menores forem as partículas do solo (solo argiloso) ou dos agregados presente neste, maior é sua capacidade de retenção de umidade e, conseqüentemente, maior a condição de anaerobiose. É sabido que, condições anaeróbicas com restrição de  $O_2$  favorecem a desnitrificação. Desta forma, bactérias anaeróbicas facultativas utilizam os óxidos  $NO_3^-$  e  $NO_2^-$  como aceptores finais de elétrons no lugar do oxigênio na fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons da respiração. Desta forma, quanto maiores às condições de anaerobiose, maior a probabilidade de se obter isolados capazes de realizar a FBN.

O M8S4, mesmo se destacando pela menor média de u. f. c. em relação aos outros manejos, este ainda manteve uma média do número de colônias diferentes igual à maioria dos manejos observados (3 colônias), o que aponta sobre a não interferência da transgenia sob o número de espécies de bactérias neste sistema de sucessão, manejo bem comum nas regiões agrícolas avaliadas (TABELA 3). Bohm e Rombaldi (2010), avaliando o efeito de métodos de controle de plantas daninhas sobre a qualidade do solo cultivado com soja transgênica, verificaram que a aplicação dos herbicidas, principalmente de glifosato, na

soja BRS 244 RR cultivada em Planossolo resultou em desestabilidade da mesofauna e maior atividade da biomassa microbiana. Nesse estudo, a atividade microbiana do solo cultivado com soja foi crescente, mas o comportamento de sua evolução foi diferente entre as safras testadas. Os valores de  $qCO_2$  (razão entre a respiração basal por unidade de biomassa microbiana do solo e por unidade de tempo) nas safras avaliadas variaram entre os tratamentos testados, mas apresentaram maior atividade microbiana, com maior liberação de  $CO_2$ , isso se deve pelo estímulo de micro-organismos do solo com funções importantes como nos processos de mineralização e imobilização de nutrientes, porém, esse resultado não foi constante entre safras (BOHM, et al., 2007; 2008; 2009).

A seguir, foram escolhidas, a partir das 4 repetições (R1, R2, R3, R4) de cada um dos 10 manejos, um total de 400 isolados para a análise de tipagem morfológica. Dentre os 400 isolados selecionados obteve-se a formação de um total de 35GG (TABELA 4; ANEXO - A). De acordo com o número de perfis e agrupamentos morfológicos obtidos, verificou-se um maior número de perfis referentes ao M4S2 (70) correspondendo a 17,5% dos isolados agrupados, porém ao analisar a distribuição dos perfis dentro dos GG, destacou-se o M1S1 com 63 perfis (15,8%) distribuídos entre 24 GG, o que supõe a presença de maior diversidade de isolados neste manejo, já que os 70 perfis referentes ao M4S2 apresentaram-se distribuídos entre 18 GG. Ainda em consideração a distribuição dos perfis nos diferentes GG, destacou-se em seguida o M9S5 (14GG), M5S3 (13GG) e M7S4 (13GG). O M2S1 apresentou seus diferentes perfis (37) distribuídos em apenas 6 GG. Mesmo o M9S5 se destacando entre os três maiores prováveis índices de diversidade morfológica de colônias, este apresenta o segundo menor número de perfis agrupados (27), juntamente ao M6S1 (27) (ambos representando 6,8% dos perfis selecionados), sendo o M10S4 o que contribuiu com o menor número de perfis (19) (4,8%) (TABELA 4).

Embora o M4 (mata ciliar) tenha apresentado o maior número de perfis agrupados, sua média de u. f. c. (186) não superou todos os sistemas de cultivo (TABELA 3). Isto se deve ao fato de que, como o meio de captura utilizado foi do tipo generalizado e considerado um meio rico por favorecer o crescimento de bactérias em menor tempo de incubação, é possível que algumas estirpes mais especializadas não tenham conseguido ter tempo hábil para competir pelos nutrientes fornecidos pelo meio de cultivo (DÖBEREINER et al., 1999).

Entre os fatores responsáveis por condições mais favoráveis ao desenvolvimento microbiano na área sob vegetação nativa, merecem destaque a ausência de preparo do solo

e a maior diversidade florística dessas áreas. A ausência de revolvimento do solo favorece o acúmulo da serrapilheira na sua superfície (o que propicia a ocorrência de menor variação e de níveis mais adequados de temperatura e umidade), a preservação de hifas fúngicas e a maior presença de raízes finas (que aumentam a entrada de substratos carbonados no sistema via exsudatos radiculares) (MENDES e REIS JUNIOR, 2004).

Tabela 4. Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grandes grupos (GG) da tipagem obtida pela análise das características morfológicas segundo Fonseca et al. (2000<sup>1</sup>).

Grupos <sup>1*</sup>	Manejo de cultivo <sup>1</sup>										Total
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	
GG1	5	9	0	5	0	0	0	0	0	0	19
GG2	4	0	0	6	0	0	1	0	0	2	13
GG3	5	0	4	0	2	5	0	0	1	0	17
GG4	1	5	0	5	1	5	0	0	0	0	17
GG5	1	4	0	0	0	0	2	0	0	0	7
GG6	6	0	4	0	0	4	0	0	0	0	14
GG7	1	0	0	6	2	0	0	1	0	4	14
GG8	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	4
GG9	2	0	0	4	0	0	0	10	1	0	17
GG10	0	0	0	2	4	0	0	1	0	0	7
GG11	0	0	2	1	5	0	7	0	2	0	17
GG12	5	0	3	1	0	4	0	0	1	0	14
GG13	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
GG14	4	0	0	2	1	0	0	0	2	0	9
GG15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
GG16	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	6
GG17	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	5
GG18	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3
GG19	3	8	0	5	0	1	0	0	0	0	17
GG20	0	2	8	0	0	0	0	1	0	0	11
GG21	0	0	0	8	1	0	3	6	4	4	26
GG22	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	4
GG23	0	0	0	1	3	0	1	7	0	0	12
GG24	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
GG25	1	0	8	0	0	0	1	0	0	0	10
GG26	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	4
GG27	1	0	8	0	0	0	3	0	0	0	12
GG28	1	0	0	6	0	0	1	0	0	0	8
GG29	1	0	0	1	3	0	3	0	6	0	14
GG30	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	6
GG31	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	6
GG32	1	9	0	11	0	4	3	8	0	0	36
GG33	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	4
GG34	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	5
GG35	4	0	12	3	8	4	2	0	0	0	33
<b>Total</b>	63	37	49	70	36	27	32	40	27	19	400

\* Grupos obtidos a partir dos agrupamentos morfológicos, representados no ANEXO - A. M1 – Monocultivo de cana-de-açúcar (alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça); M2 – Monocultivo de cana-de-açúcar (baixo teor de P no solo e adubação mineral); M3 – Cultivo de crotalária; M4 – Mata ciliar; M5 – Pousio precedido de: cana – milho – soja; M6 – Rotação: Cana – soja – milho – cana; M7 – Sucessão milho – trigo; M8 – Sucessão milho – soja RR; M9 – Sucessão milho – soja; M10 – Sucessão milho – soja orgânico.

Por outro lado, Roscoe et al. (2006), avaliando a dinâmica MO do solo em sistemas conservacionistas, demonstraram que valores mais elevados de carbono da biomassa microbiana (C-BMS) indicam que os nutrientes ficam imobilizados temporariamente resultando em menores perdas no sistema solo-planta. Estes resultados indicam que a adubação verde, a compostagem, a incorporação de resíduos vegetais, a diversificação de culturas e o mínimo de revolvimento dos solos influenciaram positivamente a biomassa microbiana, inclusive pelo fato de favorecer a manutenção da umidade e de condições mais favoráveis. Sistemas de cultivo geralmente apresentam menores conteúdos de carbono microbiano em relação a um ambiente natural (MERCANTE et al., 2008).

Áreas de pastagens também podem apresentar maiores teores de C-BMS em relação a sistemas de cultivo com intenso revolvimento do solo, conforme constatado por Oliveira et al. (2001), ao comparar áreas de cerrado sob pastagens consorciadas e sob culturas anuais contínuas, contendo soja e milho. Por outro lado, Theodoro et al. (2003) não verificaram diferenças significativas para os teores de C-BMS, entre a mata nativa e os sistemas de café orgânico, café em conversão e café convencional, na região de Santos Antônio do Amparo, Minas Gerais.

Ao comparar os manejos de monocultivo sob plantio de cana-de-açúcar, o cultivo sob solo com alto teor de P e aplicação de vinhaça (M1) apresentou 15,8% do total de isolados agrupados morfológicamente, enquanto que o cultivo sob solo com baixo teor de P e adubação mineral (M2) forneceu 9,3% do total de isolados agrupados (TABELA 4). Em contrapartida, as médias obtidas de u. f. c. para cada manejo se apresentaram próximas (136 e 184, respectivamente) e a média de colônias diferentes foi a mesma para ambos (3 colônias) (TABELA 3). Neste sentido, a discussão irá se basear nas condições limitantes envolvendo a disponibilidade de fósforo no solo em relação à comunidade microbiana.

De acordo com Tótola e Chaer (2002), há uma correlação positiva e significativa entre teor de P no solo e  $q\text{CO}_2$ . Isso indica que, quanto maior o teor de P do solo, maior serão os valores do  $q\text{CO}_2$  e, portanto, altos teores deste nutriente, podem favorecer uma condição de estresse ou de distúrbio ao sistema. Segundo Gama-Rodrigues (1999), menores valores desta variável são indicativos de uma biomassa microbiana mais eficiente, ou seja, com menor perda de carbono como  $\text{CO}_2$ , pela respiração, e com uma fração significativa de C sendo incorporada ao tecido microbiano (SILVA et al., 2010).

Corroborando com estes dados, Orr et al. (2011) verificaram a influência da presença de P, taxa de carbono e nitrogênio do solo, da concentração de amônio

disponível, bem como da taxa de respiração basal sobre a diversidade genética de bactérias do solo, como também de bactérias diazotróficas de vida livre, podendo este, variar de acordo com a época do ano, adubação (orgânica/química) e cultura.

Ao relacionar a adubação aplicada nestes dois manejos (M1 e M2), foi possível constatar que a área com aplicação da vinhaça proporcionou um incremento da microbiota. Isso se deu por conta deste material orgânico estar biologicamente novo e pronto para ser decomposto, que, associado ao alto teor de P nesta área, pode favorecer o desenvolvimento de bactérias do grupo das solubilizadoras de P, por exemplo, permitindo a disponibilidade desta molécula (GORIS et al., 2004; PAYNE et al., 2006). O aumento da atividade metabólica microbiana neste manejo também se justifica pela alta taxa de MO presente na vinhaça que fornece energia (carbono) aos micro-organismos aumentando o crescimento da biomassa. O P em relação ao manejo M2, cuja adubação é mineral ( $P^+$ ), é fornecido na forma mais assimilável pela planta não estimulando o crescimento da população de micro-organismos. Factor (2008), avaliando o desempenho de fontes de P e MO no crescimento e produtividade da cultura de cana-de-açúcar (RB72454), concluiu que a utilização de compostos orgânicos pode favorecer aumento dos teores de P no solo por favorecer melhores condições a este e sua microbiota, não observando diferenças nos resultados de acordo com a origem das fontes de P, sendo estas associadas a compostos orgânicos ou não.

Questões sobre a disponibilidade e uso do P são de extrema relevância, não só para a cultura da cana-de-açúcar, mas para todas as poaceas cultivadas comercialmente. Oliveira et al (2009) avaliou a diversidade funcional e genética de bactérias totais da rizosfera de cultivares de milho eficientes e ineficientes no uso de P, em solos com alta ou baixa disponibilidade desse elemento. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença na diversidade entre bactérias associadas a genótipos eficientes e ineficientes no uso de P. Com base no sequenciamento do 16S rDNA, foi verificado que a rizosfera de genótipos de milho sob estresse de P parece selecionar grupos específicos de bactérias e que, a estrutura populacional genética e metabólica de bactérias da rizosfera foi mais influenciada pelo teor de P no solo do que pela eficiência das plantas em usar o P. Quando as plantas crescem em um meio deficiente em P, as raízes podem excretar substâncias funcionais que constituem um importante mecanismo de adaptação à variação de P no ambiente (MARSCHNER et al., 2006; LI et al., 2004).

Considerando os manejos M5S3 (área de pousio antecedida de plantio de cana-de-açúcar, milho e soja) e M7S4 (área sob sucessão das culturas de milho e trigo), estes apresentaram, respectivamente, 9% (36 isolados) e 8% (32 isolados) das estirpes agrupadas. Ambos não diferiram entre si quanto ao número de isolados agrupados pela morfologia das colônias, porém apresentaram médias de u. f. c. consideravelmente diferentes.

Quanto ao M7, ao considerar a terceira menor média de u. f. c. (TABELA 3) em relação a sua posição quanto a distribuição dos perfis dentro dos GG (TABELA 4), acredita-se que a diversidade morfológicas se manteve muito mais devido à alta microbiota natural do solo, considerado de alta fertilidade (S4), do que devido ao manejo, que, por se tratar de duas Poaceae, não permite a variação na liberação de diferentes exsudados pelas raízes para selecionarem distintas bactérias. A interação química específica entre bactérias e a planta hospedeira é mediada pela produção de flavonóides (flavonas, flavanonas e isoflavonas) e estes compostos variam entre as espécies de planta (HUNGRIA, 1994). A quantidade e a qualidade dos exsudatos liberados pela raiz também alteram a química do solo e influenciam a comunidade bacteriana que coloniza a rizosfera e utiliza esses exsudados como fonte de carbono (BAUDOIN et al., 2001; RICHARDSON et al., 2009). A composição desses exsudatos pode variar com a idade e o genótipo da planta, o metabolismo, a condição nutricional, o tipo de estresse e outros fatores ambientais (LIU et al., 2004; BAREA et al., 2005; RICHARDSON et al., 2009).

Em relação ao M5S3 (pousio antecedido de rotação de culturas – cana-de-açúcar, milho, soja), acredita-se que a diversidade da comunidade microbiana, representada pela distribuição dos perfis dentro dos GG juntamente a terceira maior média de u. f. c., tenha sido reestabelecida pelo uso de uma leguminosa (soja) associada a rotação com cana-de-açúcar que antecede o pousio, possibilitando, conforme apontado por Machado et al. (2011), o suprimento de N para este manejo. De acordo com Dommergues et al. (1999), as leguminosas fornecem material formador de serapilheira rico em N que, além de melhorar a fertilidade do solo, reduz a erosão e serve de substrato para melhorar a estruturação e as propriedades biológicas do solo.

Hsu e Buckley (2009) trabalhando com monocultivo de milho verificaram maior biodiversidade quanto à comunidade de diazotróficos do solo em área controle (pousio), onde não houve revolvimento do solo e influência da cultura, além de apresentar maior presença de raízes finas devido ao crescimento de uma grande diversidade de plantas

daninhas. A menor biodiversidade foi verificada em áreas sob plantio convencional e com retenção de biomassa. Com isso, verificou-se que há influência da retenção de biomassa sobre a composição das comunidades de diazotróficos no solo, proporcionando neste caso, a dominância de certas unidades taxonômicas operacionais quando comparadas a áreas sem retenção de biomassa.

O manejo com crotalária de cobertura (M3S1) apresentou 12,3% do total de perfis agrupados pelas tipagem morfológica (TABELA 4). De acordo com Reis Junior et al. (2002), Prado (2009) e Machado et al. (2011), o uso de leguminosas forrageiras, como por exemplo, a crotalária, vem sendo bastante estudada devido ao seu potencial em suprir o N em pastagens de poaceas, quando realizado consórcio entre ambas, principalmente devido a sua alta capacidade de simbiose com bactérias diazotróficas, além de contribuir efetivamente para a produção e sustentabilidade dos sistemas de produção animal em pastejo. Além disso, uma grande vantagem do consórcio entre cultivo de leguminosas e não leguminosas está voltado à redução de custos, justamente pelo menor uso de fertilizantes nitrogenados, devido ao suprimento nitrogenado gerado pelas leguminosas (FONTENELE et al., 2009) .

Para completar as análises destes resultados é preciso inferir sobre a tipagem construída a partir dos isolados obtidos dos diferentes manejos culturais. A caracterização morfológica de colônias de bactérias é importante como uma primeira aproximação para avaliação da diversidade de populações microbianas. O estudo de um maior número de representantes das populações pode tornar-se viável com o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes. Dessa forma, a seleção de representantes dos grupos permitirá que nas etapas posteriores de caracterização, um número menor de isolados possa ser avaliado com menor perda da informação acerca da diversidade do sistema agroecológico (HUNGRIA et al., 2001b).

#### **4.2 Análise de Agrupamento dos Produtos Obtidos por *rep*-PCR**

Dos 400 isolados selecionados quanto a caracterização morfológica a partir dos diferentes manejos de cultivo em estudo, 269 foram submetidos à reação de PCR com o “primer” BOX A1R (*rep*-PCR) juntamente com mais 7 bactérias consideradas padrões, obtendo portanto, um total de 276 perfis. Após as análises de agrupamento geradas pelo índice de Jaccard a 60% de similaridade, verificou-se que 260 destes perfis apresentaram-se distribuídos entre 25 grandes grupos (GGs) formados e os 16 restantes foram considerados

perfis isolados. Dentre o total de perfis obtidos (276) pôde-se observar 168 perfis distintos entre sí. Destes, 152 foram encontrados distribuídos dentro dos grandes grupos (GGs). Entre os perfis isolados se encontram as bactérias padrões *Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp., enquanto que as estirpes *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Paenebacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Azospirillum* spp. apresentaram semelhança a isolados agrupados e, portanto, distribuídos entre os GGs formados (TABELA 5; ANEXO - B).

Tabela 5. Distribuição dos isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, segundo a classificação em grandes grupos (GG) do dendrograma obtido pela análise dos produtos de BOX-PCR<sup>1</sup>.

GG*	Número total	Tipos de manejo de cultivo										Bactérias padrões
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	
1	17		2			4		1	7	1	2	
2	5		2									3
3	3			1						2		
4	2				1		1					
5	7	2	3						1	1		
6	3		1				1			1		
7	13	4	3	3			1	1		1		
8	4	2				1				1		
9	4	2		1								1
10	6	2		4								
11	25	4		10		5	2		4			
12	45	3	2	5		3	6	6	4	3	13	
13	4	1	1						1			1
14	3	1		1			1					
15	4			1			1	1		1		
16	2		1	1								
17	70	1	5	7	16	7	9	11	4	7	3	
18	6	1			2			1		1	1	
19	4					2				1	1	
20	4	1		1			1		1			
21	6				3			2	1			
22	2	1	1									
23	9		5		1			3				
24	10		1	2	2	3		2				
25	3				1			1	1			
<b>Total</b>	<b>260</b>	<b>25</b>	<b>27</b>	<b>37</b>	<b>26</b>	<b>25</b>	<b>23</b>	<b>28</b>	<b>24</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>5</b>

\*Grupos obtidos a partir dos agrupamentos genéticos, representados no ANEXO B. M1 – Monocultivo de cana-de-açúcar (alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça); M2 – Monocultivo de cana-de-açúcar (baixo teor de P no solo e adubação mineral); M3 – Cultivo de crotalária; M4 – Mata ciliar; M5 – Pousio precedido de: cana – milho – soja; M6 – Rotação: Cana – soja – milho – cana; M7 – Sucessão milho – trigo; M8 – Sucessão milho – soja RR; M9 – Sucessão milho – soja; M10 – Sucessão milho – soja orgânico.

O GG17 foi o que apresentou maior número de perfis (70), com isolados advindos de todos os tipos de manejo (TABELA 5). Neste GG destaca-se o manejo M4S2 (área de mata ciliar), por contribuir com o maior número de perfis (16 perfis), seguido pelos manejos M7S4 (área de sucessão: Milho – trigo) e M6S1 (área de rotação: Cana - soja - milho – cana) com 11 e 9 perfis, respectivamente. Neste agrupamento, é possível verificar

a formação de 5 subgrupos (SG), todos compostos por mais de um manejo: SG17A (composto por 3 perfis e estes providos de solos diferentes), SG17B (19 perfis), SG17C (24 perfis), SG17D (11 perfis) e SG17E (13 perfis). Os SG17B e SG17C destacam-se por apresentar o maior número de perfis 100% similares, sendo estes, 12 e 21 perfis respectivamente, ambos apresentando isolados de solos sob diferentes manejos. Já no SG17E, dos nove perfis agrupados considerados 100% similares, oito foram obtidos a partir do M4S2, que se encontra sob mata ciliar (ANEXO - B).

Com 45 perfis, o segundo maior grande grupo é o GG12. O maior número de perfis deste agrupamento refere-se a isolados obtidos a partir do M10S4 (área sob Sucessão: Milho - soja orgânico), com um total de 13 perfis. Os restantes dos perfis do GG12 ocorrem a partir de todos os outros solos selecionados, com exceção do M4S2 que não apresentou perfil para este grupo. A formação de subgrupos também é sugerida pelo dendrograma para este agrupamento. No SG12B, de cinco perfis considerados idênticos (100% de similaridade) quatro foram obtidos do M10S4 e um do M7S4. No SG12D, de seis perfis considerados idênticos (100% de similaridade) cinco foram obtidos do M10S4 e um do M7S4 (TABELA 5; ANEXO - B).

O terceiro grande grupo em número de perfis é o GG11 apresentando um total de 25 polimorfismos. Destes, 10 perfis referem-se a isolados obtidos a partir do manejo M3S1 (área com cultivo de crotalária) e os demais distribuídos entre os manejos M1S1 (área com monocultivo de cana-de-açúcar cultivada sob solo com alto teor de P e aplicação de vinhaça), M5S3 (área de pousio precedido de: Cana - milho - soja), M6S1 (cana - soja - milho - cana) e M8S4 (área de sucessão: Milho - soja RR), apresentando, respectivamente, 4, 5, 2 e 4 perfis polimórficos. Neste contexto, o GG1 também foi considerado um bom agrupamento, pois apresentou um total de 17 perfis obtidos a partir de diferentes tipos de manejo, sendo estes: M2S1, M5S3, M7S4, M8S4, M9S5 e M10S4 (TABELA 5).

Os GG 23 e 24 apresentaram, respectivamente, 9 e 10 perfis dos totais obtidos. Para o agrupamento 23, os polimorfismos foram obtidos a partir dos manejos M2S1, M4S2 e M7S4 enquanto que, para o GG24 os perfis foram arrançados entre os manejos M2S1, M3S1, M4S2, M5S3 e M7S4. Os demais agrupamentos (GGs 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 e 25) apresentaram entre 2 e 7 perfis advindos de pelos menos mais de uma classe de solo, ou seja, de diferentes manejos agrícolas (TABELA 5). Nos GGs 11, 12, 17, 23 e 24 foram identificados mais 15 subgrupos (SGs) formados por

similaridades mais estreitas entre si. Dentre os GGs, 11 deles (1,7, 10, 11, 12, 17, 18, 19, 21, 23 e 24) uniram bactérias com perfis idênticos, mas de origens distintas (ANEXO - B).

Não há nenhum GG apresentando todos os perfis a partir de um único solo. O maior número de isolados molecularmente caracterizados destaca-se ao M3S1 com 37 perfis, enquanto os M9S5 e M10S4 apresentaram o menor número (20 cada um). Os demais manejos não diferiram entre si quanto ao número de perfis obtidos (TABELA 5).

Vale ressaltar que o GG2 apresentou 5 perfis polimórficos, sendo dois destes referentes ao M2S1 e 3 deles identificados como sendo as estirpes padrões LGMB 114 - *Bacillus subtilis*, IBSBF 900 - *Bacillus* sp. e LGMB 161 - *Paenibacillus* sp., indicando portanto, similaridade dos dois perfis referentes ao M2S1 (monocultivo de cana) com indivíduos do grupo bacilos. A presença de isolados do gênero *Bacillus* sp. associadas endofiticamente a plantas de cana-de-açúcar já foi descrita por Velázquez et al. (2008) em estudo sobre diversidade genética de bactérias endofíticas presentes na seiva apoplástica do parênquima medular de plantas de cana. Além disso, trabalhos desenvolvidos por Dalton e Kramer (2006); Nehl e Knox (2006); Beneduzi et al. (2008) e Islam et al. (2012), relatam a associação deste grupo a várias Poaceae, dentre elas: arroz, milho e trigo, a qual foi utilizada como planta isca neste trabalho.

O GG9 e GG13 também apresentaram em seus agrupamentos as estirpes padrões *Pseudomonas* sp. e *Azospirillum* sp., respectivamente. A presença da estirpe padrão de *Pseudomonas* sp. juntamente ao GG9 nos permite inferir sobre uma possível presença de isolados pertencentes a este gênero no manejo com monocultivo de cana-de-açúcar cultivada sob solo com alto teor de P e aplicação de vinhaça (M1), como também no manejo com cultivo de crotalária (M3). Magnani et al. (2010) e Magnani (2005), verificaram uma grande diversidade de gêneros bacterianos endofíticos associados a cana-de-açúcar, dentre eles, destaca-se a predominância de várias espécies de *Pseudomonas*, presentes tanto nas folhas quanto nos colmos das plantas. Além disso, a presença de *Pseudomonas* associadas a plantas leguminosas também foi descrita por Kuklinsky-Sobral et al. (2004) em plantas de soja, como também em plantas iscas de caupi, amendoim, soja, bracatinga, maricá e angico descritas por Lammel (2007). Como o M1S1 é um manejo classificado como um solo rico em P, vale ressaltar também que, um dos principais fatores que justificam essa possível interação de *Pseudomonas* a este manejo, é o fato de que bactérias do gênero *Pseudomonas* destacam-se entre as bactérias mais eficientes como solubilizadoras de fosfato (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

A associação de *Azospirillum* a várias não leguminosas é vastamente descrita (BRASIL et al., 2005; TEJERA et al. 2005; MEHNAZ et al., 2007b; SALAMONE et al., 2010; SILVA, 2010; VENIERAKI et al., 2011). Portanto, a associação deste gênero a espécies como cana-de-açúcar e milho são facilmente confirmadas, o que justifica a possível semelhança de isolados providos dos manejos M1S1, M2S1 e M8S4 com a estirpe padrão *Azospirillum* sp.

De acordo com os perfis apresentados, constatou-se um elevado grau de polimorfismo, ou seja, de diversidade entre os isolados investigados. A inferência sobre diversidade bacteriana através de agrupamentos por *rep*-PCR tem sido explorados com sucesso por vários trabalhos em busca de micro-organismos potenciais e patogênicos. Recentemente no Irã, isolados de *Ralstonia solanacearum* oriundos de batata foram agrupados através da *rep*-PCR por origem geográfica, separando os isolados mundialmente distribuídos daqueles com características genotípicas e fenotípicas relacionados à biovar 2T originária da América do Sul (NOURI et al., 2009). Isolados de *R. solanacearum* em batata avaliados nas Filipinas, também por análise de ERIC e BOX-PCR, revelou grande variabilidade genética (NATURAL et al., 2005).

#### **4.3 Análise dos Índices de Diversidade e Riqueza Obtidos para as Populações de Endofíticos**

Os índices de diversidade foram concordantes em apontar o manejo M1S1 como sendo o de maior diversidade tanto para os grupos morfológicos quanto genotípicos. Entretanto, com relação à riqueza, enquanto que os grupos morfológicos corroboram com esta conclusão, nos grupos formados através da técnica de *rep*-PCR, o maior índice ocorreu no manejo M9S5. Sendo assim, como a variação do índice de Simpson ocorreu de maneira semelhante aquela do índice de Shannon, as diferenças entre os valores de riqueza (ACE) e diversidade (Shannon e Simpson) parecem indicar uma variação na distribuição quanto a dominância dos grupos genéticos dentro da comunidade, e não quanto à sua riqueza ou abundância (TABELA 6; TABELA 7).

De acordo com Loreau et al. (2001), estas diferenças na avaliação da diversidade bacteriana são de extrema importância quando levado em consideração o aumento na produção vegetal. O aumento concomitante destes dois fatores se torna favorável até certo ponto, porém, ultrapassado este, o aumento da diversidade leva a uma diminuição da produção. Nestas condições, afirma-se que a abundância de espécies metabolicamente favoráveis a planta se torna um fator mais relevante ao aumento na produtividade do que

sua riqueza, já que o tipo de metabolismo no solo é mais importante do que a diversidade de espécies.

Tabela 6. Índices de diversidade, estimados pela tipagem morfológica segundo Fonseca et al. 2000, de isolados obtidos de solos de diferentes classes e manejos de cultivo<sup>1</sup>.

Manejos de cultivo	Índice de diversidade					
	Índice de Shannon	Shannon mod	Índice de Simpson	Riqueza (ACE)	Grupos Observados	Grupos Esperados em coleta futura
<b>M1S1</b>	3,006 (0,076) <sup>2</sup>	3,239 (0,183)	0,05719 (0,00723)	35,3 (7,0)	24	8,8 (3,5)
<b>M2S1</b>	1,688 (0,067) <sup>2</sup>	1,716 (0,075)	0,19795 (0,01697)	6,0 (0,0)	6	0,0 (0,0)
<b>M3S1</b>	1,943 (0,070) <sup>2</sup>	1,977 (0,075)	0,15868 (0,01343)	8,0 (0,0)	8	0,0 (0,0)
<b>M4S2</b>	2,682 (0,080) <sup>2</sup>	2,846 (0,104)	0,08204 (0,01103)	22,2 (3,0)	18	2,9 (1,6)
<b>M5S3</b>	2,354 (0,106) <sup>2</sup>	2,580 (0,136)	0,11420 (0,01868)	16,0 (3,1)	13	1,9 (1,2)
<b>M6S1</b>	1,878 (0,057) <sup>2</sup>	1,937 (0,090)	0,15775 (0,01751)	7,3 (0,6)	7	0,8 (0,0)
<b>M7S4</b>	2,368 (0,108) <sup>2</sup>	2,632 (0,195)	0,11133 (0,01963)	17,0 (3,9)	13	2,6 (1,4)
<b>M8S4</b>	1,968 (0,107) <sup>2</sup>	2,137 (0,186)	0,16250 (0,04057)	14,9 (5,3)	10	6,3 (0,0)
<b>M9S5</b>	2,365 (0,123) <sup>2</sup>	2,742 (0,199)	0,11385 (0,02129)	19,3 (5,5)	13	3,2 (1,6)
<b>M10S4</b>	1,850 (0,094) <sup>2</sup>	2,018 (0,165)	0,16898 (0,01789)	7,4 (0,8)	7	0,4 (0,4)

<sup>1</sup>Parâmetros definidos: m=1000 (tamanho da amostragem) e k=4 (valor de corte, “cut-off”). <sup>2</sup>Erro padrão da média apresentado entre parênteses. M1 – Monocultivo de cana-de-açúcar (alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça); M2 – Monocultivo de cana-de-açúcar (baixo teor de P no solo e adubação mineral); M3 – Cultivo de crotalária; M4 – Mata ciliar; M5 – Pousio precedido de: cana – milho – soja; M6 – Rotação: Cana – soja – milho – cana; M7 – Sucessão milho – trigo; M8 – Sucessão milho – soja RR; M9 – Sucessão milho – soja; M10 – Sucessão milho – soja orgânico.

Tabela 7. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de *rep*-PCR amplificados pelo primer BOX, de isolados obtidos de solos de diferentes classes e manejos de cultivo<sup>1</sup>.

Manejos de cultivo	Índices de diversidade					
	Índice de Shannon	Shannon mod	Índice de Simpson	Riqueza (ACE)	Grupos Observados	Grupos Esperados em coleta futura
<b>M1S1</b>	2,422 (0,105) <sup>2</sup>	2,819 (0,206)	0,10080 (0,01555)	17,8 (4,4)	13	3,8 (1,7)
<b>M2S1</b>	2,302 (0,113) <sup>2</sup>	2,612 (0,191)	0,11660 (0,01898)	16,1 (4,0)	12	2,5 (1,3)
<b>M3S1</b>	2,127 (0,130) <sup>2</sup>	2,371 (0,238)	0,15267 (0,03562)	20,4 (7,4)	12	2,9 (1,6)
<b>M4S2</b>	1,318 (0,213) <sup>2</sup>	1,596 (0,258)	0,40828 (0,11670)	9,6 (2,9)	7	2,7 (1,0)
<b>M5S3</b>	1,811 (0,096) <sup>2</sup>	1,915 (0,128)	0,18080 (0,02285)	7,4 (0,8)	7	0,4 (0,5)
<b>M6S1</b>	1,748 (0,191) <sup>2</sup>	2,159 (0,313)	0,24008 (0,07381)	24,4 (15,2)	9	4,6 (2,7)
<b>M7S4</b>	1,878 (0,168) <sup>2</sup>	2,187 (0,227)	0,21284 (0,05520)	17,8 (7,6)	10	2,7 (1,7)
<b>M8S4</b>	1,917 (0,141) <sup>2</sup>	2,186 (0,291)	0,17708 (0,04524)	15,2 (6,5)	9	5,1 (-1,0)
<b>M9S5</b>	2,081 (0,189) <sup>2</sup>	2,669 (0,422)	0,17500 (0,05001)	37,2 (23,0)	11	6,8 (3,3)
<b>M10S4</b>	1,094 (0,211) <sup>2</sup>	1,319 (0,269)	0,46000 (0,15320)	6,8 (2,9)	5	1,2 (1,3)

<sup>1</sup>Parâmetros definidos: m=1000 (tamanho da amostragem) e k=4 (valor de corte, “cut-off”). <sup>2</sup>Erro padrão da média apresentado entre parênteses. M1 – Monocultivo de cana-de-açúcar (alto teor de P no solo e aplicação de vinhaça); M2 – Monocultivo de cana-de-açúcar (baixo teor de P no solo e adubação mineral); M3 – Cultivo de crotalária; M4 – Mata ciliar; M5 – Pousio precedido de: cana – milho – soja; M6 – Rotação: Cana – soja – milho – cana; M7 – Sucessão milho – trigo; M8 – Sucessão milho – soja RR; M9 – Sucessão milho – soja; M10 – Sucessão milho – soja orgânico.

Em relação aos grupos morfológicos, quando considerados os índices de diversidade e riqueza, os manejos M1S1 e M2S1 apresentam-se como aqueles de maiores e menores valores, respectivamente. Isso indica que o manejo com monocultivo de cana-de-açúcar cultivada sob solo com alto teor de P e aplicação de vinhaça favorece o desenvolvimento de um maior número de espécies, refletido em uma maior diversidade quando comparado aos demais manejos. Já os menores índices para o manejo com monocultivo de cana-de-açúcar e adubação mineral, demonstram uma maior dominância de espécies neste manejo, com maior índice de espécies raras (TABELA 6). Considerando que o mesmo tipo de cultura e solo é compartilhado entre estas amostras, o resultado indica o nível de fósforo como o principal fator determinante dos valores diferentes. Silva e Nahas (2002) encontraram uma menor diversidade bacteriana em solos fertilizados com fósforo mineral do que naqueles não fertilizados, resultado corroborado por Lima et al. (1996). Anteriormente, Martyniuk e Wagner (1978) relataram o oposto. Entretanto, o conteúdo de fósforo orgânico parece ser o fator limitante, sendo que a fertilização do solo com superfosfato ou fósforo mineral diminuiria este conteúdo, resultando em uma menor diversidade (SILVA e NAHAS, 2002).

Em seguida, os maiores valores de riqueza de espécies (ACE) quanto a caracterização morfológica foram apresentados pelos manejos M4S2 (mata ciliar) e M9S5 (sucessão milho-soja convencional). De acordo com o índice de Simpson e Shannon, a amostra com manejo M4S2 apresentou maior diversidade em relação ao M9S5, apresentando esta, portanto, maior dominância de espécies em relação ao M4S2 (TABELA 6). Ao relacionar os índices de diversidade e riqueza entre manejos M4S2 e M9S5 quanto a caracterização genética, observa-se que estes índices apresentam-se bastante distintos, indicando maior dominância e número de espécies raras no manejo M4S2 quando comparado ao M9S5, apresentando este, maior diversidade e riqueza (TABELA 7).

A maior dominância de espécies no M4S2 em relação ao M9S5 apresentado pelo índice de Shannon e Simpson, também foi verificada por Pereira (2003), em estudos sobre a diversidade entre amostras obtidas de florestas e áreas cultivadas, onde se obteve uma maior diversidade bacteriana e dominância de um grupo nas amostras provenientes de áreas de floresta. Fierer e Jackson (2006) relatam que o pH do solo é o principal fator que delimita a diversidade e riqueza de uma comunidade microbiana. Shu et al. (2012), por exemplo, observaram maior presença de diazotróficos em áreas onde o pH apresentava-se mais ácido. Entretanto, este fator não explicaria a diferença encontrada neste trabalho, com

relação aos índices de diversidade, riqueza e a correlação significativa entre os grupos genéticos e a classe de solo, uma vez que os solos amostrados são todos de natureza ácida.

Ao se observar os resultados obtidos quanto aos grupos esperados em coletas futuras para as características morfológicas, verificou-se que o M1S1 destaca-se entre os demais como sendo o manejo mais adequado, levando em consideração classe de solo e região, permitindo assim, a sobrevivência de um maior número de espécies nesta área. Já os manejos M2S1 e M3S1 nestas condições de solo e região, não favorecem a microbiota do solo e tendem a nulidade de espécies. De acordo com os resultados obtidos pelo cálculo do coeficiente de Spearman, esta relação entre os agrupamentos gerados a partir das características morfológicas com classe de solo, região e manejo também pôde ser observada (ANEXO - D). A relação de diversidade e distribuição geográfica, manejo de cultivo e classe de solo já está bem documentada (LATOURET et al., 1996; CHIARINI et al., 1998; GRAYSTON et al., 1998; BUYER et al., 1999; MARSCHNER et al., 2001; WIELAND et al., 2001; da SILVA et al., 2003; GARBEVA et al., 2004).

De acordo com os dados apontados na tabela 7 quanto aos índices de diversidade e riqueza genética dos isolados em relação aos diferentes manejos, pôde-se observar maior diversidade para o M1S1, tanto pelo índice de Shannon quanto pelo índice de Simpson. A menor diversidade apontada por estes índices refere-se ao M10S4, indicando, portanto, maior dominância de espécies para este manejo. Em relação à riqueza, os dados apontam o manejo M9S5 como sendo o de maior riqueza, não corroborando com o índice de diversidade. Quanto à menor riqueza, estes dados corroboram com o índice de diversidade apontando o M10S4. Conforme os resultados apresentados quanto aos grupos esperados em coleta futura para as características genéticas, verificou-se que o M9S5 destaca-se entre os demais como sendo o manejo mais adequado (levando em consideração classe de solo e região), permitindo assim, a sobrevivência de um maior número de espécies nesta área. Já o manejo M5S3 e M10S4, são os manejos que menos favorecem a microbiota do solo.

Aplicando-se o coeficiente de Spearman entre os grupos formados através da análise genética, pôde-se observar uma correlação significativa com a classe de solo ( $p \leq 0,05$ ), mas não com o manejo ou região (ANEXO - E). Schloeter et al. (2000) concluíram que a diversidade bacteriana em simbioses ou fitopatógenos endofíticos é menor do que entre organismos de vida livre e que este resultado ocorre possivelmente devido a uma influência unidirecional e predominante do hospedeiro, enquanto que bactérias expostas a várias outras forças seletivas poderiam ter mantido uma alta capacidade adaptativa. Zhang

et al. (1999) investigando a diversidade de *Bradyrhizobium japonicum* através de análise de ácidos graxos e *rep*-PCR, encontrou uma forte influência do cultivar. Dalmastrri et al. (1999) comparou os efeitos da classe de solo, cultivares de milho e localização radicular com a microdiversidade de populações de *Burkholderia cepacia* associadas a raízes e encontrou maior influência do primeiro fator. Um percentual maior de variação foi encontrado entre populações isoladas de um mesmo cultivar proveniente de diferente solo, do que entre populações originadas de diferentes cultivares ou compartimentos distintos da rizosfera ou rizoplano.

Alterações na comunidade microbiana e na sua atividade interferem diretamente nos processos biológicos e bioquímicos do solo, na produtividade agrícola e, conseqüentemente, na sustentabilidade dos agroecossistemas, atuando como indicador de degradação dos solos (MATSUOKA et al., 2003). Tais alterações são ocasionadas, entre outros fatores, pelo tipo de cultura, condições ambientais, interações entre organismos e, principalmente, pelo sistema de cultivo e sucessões de culturas adotadas (MERCANTE et al., 2008). Estes resultados ressaltam que ainda se conhece pouco sobre a real influência dos diferentes fatores na diversidade de comunidades microbianas, bem como o impacto desta sobre a produção vegetal e processos metabólicos nos diferentes tipos de solo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o manejo com sucessão de milho e soja (orgânico) no LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico favoreceu o crescimento bacteriano, destacando-se com a maior média de unidades formadoras de colônias (u. f. c.), porém apresentou-se entre os menores índices de diversidade e riqueza morfo-genética, indicando maior dominância de espécies nesta área.

Ao relacionar a média de contagem de u. f. c. aos tipos de solo, pôde-se observar que os manejos conduzidos sob solo classificado como ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico apresentaram médias semelhantes entre si, com média de colônias morfológicamente diferentes igual ou superior às médias obtidas nos Latossolos e Nitossolo.

Aplicando-se o coeficiente de Spearman entre os grupos formados através da análise genética e morfológica, pôde-se observar uma correlação significativa entre os genogrupos e classe de solo, não apresentando correlação deste com manejo e região. Os grupos morfológicos apresentaram correlação significativa com classe de solo, região e tipo de manejo.

O solo coletado em mata ciliar apresentou alta diversidade e riqueza com relação aos grupos morfológicos, mas não em relação aos genogrupos. A redução nos índices de diversidade e riqueza genética em relação às características morfológicas para esta área, se justificam pela alta presença de indivíduos deste manejo dentro de um mesmo grande grupo, como por exemplo, o grande grupo (GG) 17 (GG com maior número de perfis genotípicos com isolados advindos de todos os tipos de manejo), onde de 26 perfis agrupados 16 encontram-se neste GG. Nos agrupamentos morfológicos verificou-se o maior número de perfis deste manejo (11) no GG33, maior GG gerado pelos agrupamentos morfológicos.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo evidenciaram a importância de se concentrar esforços para conhecer melhor a diversidade das rizobactérias nos solos brasileiros permitindo a busca de indivíduos com potenciais biotecnológicos para a fixação biológica de nitrogênio e para a promoção de crescimento vegetal.

## 6 CONCLUSÕES

- O manejo com sucessão milho-soja em sistema orgânico apresentou a maior média de unidades formadoras de colônias (u. f. c.). A menor média foi observada no manejo com sucessão milho-soja RR. A maior média de colônias morfológicamente diferentes foi encontrada na área de mata ciliar e na área com cultivo de crotalária sob ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico.
- Para as características morfológicas, o manejo com monocultivo de cana-de-açúcar cultivada sob solo classificado como ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico em área com alto teor de P e aplicação de vinhaça, destaca-se entre os demais como sendo o manejo mais adequado, levando em consideração classe de solo e região, permitindo assim, a sobrevivência de um maior número de espécies. O manejo com monocultivo de cana-de-açúcar cultivada sob solo com baixo teor de P e adubação mineral em ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico destacou-se por apresentar os menores valores de diversidade e riqueza.
- De acordo com os índices de diversidade, riqueza e grupos esperados em coleta futura para as características genéticas, destacou-se o manejo com monocultivo de cana-de-açúcar cultivada sob solo com alto teor de P e aplicação de vinhaça como sendo o mais favorável a diversidade. A área com sucessão milho-soja em sistema de plantio convencional sob solo NITOSSOLO VERMELHO Eutroférico destacou-se por favorecer a sobrevivência de um maior número de espécies e grupos esperados em coleta futura quando comparado aos demais. O manejo com sucessão milho-soja em sistema orgânico sob LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico foi o menos favorável a diversidade e riqueza, proporcionando, portanto, maior dominância de espécies nesta área.
- Os resultados demonstraram a ocorrência de uma alta diversidade nas áreas de coleta, considerando-se as diferentes classes de solo e manejo de cultivo, resultando em 35 grandes grupos quanto à caracterização morfológica e 25 grandes grupos para a caracterização genética;
- As classes de solo, o manejo de cultivo e a vegetação características das diferentes áreas de coleta influenciaram concomitantemente na dominância de determinados grupos morfo-genéticos dentro da comunidade.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1298-1307, 2006.

ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (eds). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA- SPI, p.63-94, 1994.

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 417-432, 2009.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, p. 57-67, 1998.

ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Micro-organismos de Importância Agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, CNPAR: Centro Nacional de Pesquisa de Soja, CNPSo. Brasília, DF: Embrapa – SPI, 1994, 236 p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 44).

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L. et al. **Manual de isolamento de micro-organismos endofíticos**. Departamento de Genética. Escola superior de Agricultura “Luis Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ASSIS JÚNIOR, S. L.; ZANUNCIO, J. C.; KASUYA, M. C. M. et al. Atividade microbiana do solo em sistemas agroflorestais, monoculturas, mata natural e área desmatada. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p. 35-41, 2003.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: Fundamentals and applications**. 4. ed. Menlo Park, Benjamin/Cummings, 1998, 694p.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1559-1570, 2010.

BAIN, J. M.; TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D. et al. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1469-1477, 2007.

BALATTI, A. P. **Producción de inoculantes para Leguminosas: tecnología de las fermentaciones aplicada a los géneros *Rizhobium* y *Bradyrhizobium***. La Plata, 1992, 152 p.

BALDANI, V. Protocolo para a análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em plantas não leguminosas. In. XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, RELARE. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja. Documentos 290, p 124-142, 2007.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais**. Academia Brasileira de Ciências, v.77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D. et al. Recent advance in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 911- 922, 1997b.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M. et al. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais**. Academia Brasileira de Ciências, n. 56, p. 365, 1984.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. et al. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisulbalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p. 65-73, 1992.

BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E. et al. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais**. Academia Brasileira de Ciências, v. 69, 1997a, 116p.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M. et al. Ocorrência de bactérias e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1265-1276, 1999.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M. et al. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 6, p. 627-639, 1997.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S. et al. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p. 2635-2643, 2007.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1761-1778, 2005.

BARKA, E. A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7246-7252, 2006.

BARUA, S.; TRIPATHI, S.; CHAKRABORTY, A. et al. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. **Microbiological Research**, v. 167, n. 2, p. 95-102, 2012.

BARRIUSO, J.; SOLANO, B. R.; LUCAS, J. A. et al. Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria. Cap. 1, p. 1-17. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (ed). Plant-Bacteria Interactions. **Strategies and Techniques to Promote Plant Growth**, 2008, 310 p.

BASSOI, M. C.; FRONZA, V.; SCHEEREN, P. L. et al. Desempenho agronômico da cultivar de trigo BRS Pardela, no Mato Grosso do Sul, em São Paulo e em Santa Catarina, e aptidão tecnológica. 18. Embrapa Trigo. In: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, 2., 2008, Passo Fundo. **Ata e resumos: Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale: Embrapa Trigo: Embrapa Transferência de Tecnologia**, p. 35-37, 2008.

BASSOI, M. C.; RIEDE, C. R.; CAMPOS, L. A. C. et al. Cultivares de trigo Embrapa: as informações sobre as cultivares são de responsabilidade da instituição obtentora. p. 36-37. In: **Cultivares de trigo Embrapa e Iapar**, Embrapa Soja, 2010, 60 p. (Documentos/Embrapa Soja, n.321)

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulatons**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1183-1192, 2003.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 311-320, 2008.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M. et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 215-229, 2004.

BINOTTI, F. F. S. **Manejo do nitrogênio no feijoeiro de inverno em sucessão a milho e *Brachiaria* em sistema plantio direto**. Ilha Solteira, 2009, 178p. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, 2009.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological Biotechnology**, v.80, p.199-209, 2008.

BHERING, S. B.; SANTOS, H. G. **Mapa de solos do Estado do Paraná, Legenda Atualizada**. Rio de Janeiro: Embrapa Florestas: Embrapa Solos: Instituto Agrônômico do Paraná, 2008, 74p.

BINDE, D. R.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. et al. *rep*-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of fifty-four elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 897-908, 2009.

BOHM, G. M. B.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. et al. Glyphosate - and imazethapyr - induced effects on yield, nodule mass and biological nitrogen fixation in field-grown glyphosate-resistant soybean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, n.2, p.420-422, 2009.

BOHM, G. M. B.; CASTILHOS, D.; PIGOSSO, G. et al. Efeito do controle de plantas concorrentes na biomassa e atividade microbiana em planossolo cultivado com soja BRS 244RR. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.4, p. 503-508, 2007.

BOHM, G. M. B.; GENOVESE, M. I.; PIGOSSO, G. et al. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico, e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154 cultivadas em planossolo. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 192-197, 2008.

BOHM, G. M. B.; ROMBALDI, C. V. Transformação genética e aplicação de glifosato na microbiota do solo, fixação biológica de nitrogênio, qualidade e segurança de grãos de soja geneticamente modificada. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 213-221, 2010.

BOTTNER, P.; PANSU, M.; SALLIH, Z. Modeling the Effect of Active Roots on Soil Organic Matter Turnover. **Plant Soil**, v. 216, p. 15-25, 1999.

BRADSHAW, R. E.; FOSTER, S. J.; MONAHAN, B. J. Molecular diagnostic tools for detection of plant pathogenic fungi. In: RAO, J.R.; FLEMING, C.C.; MOORE, J.E. (Eds.) **Molecular diagnostics - current technology and applications**, Horizon Bioscience, p. 47-69, 2006.

BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seção III – Biologia do Solo. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 29, p. 179-190, 2005.

BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C.A. et al. (Ed.). **Applications of PCR in mycology**. Oxon, London: CAB International, p. 243-266, 1998.

BROUGHTON, W.J.; DILLWORTH, M.J. Control of leghaemoglobin synthesis in snakes beans. **Biochemistry Journal**, v. 125, n. 4, p.1075-1080, 1971.

BUCHENAUER, H. Biological control of soilborne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.

BUCKLAND, S. T.; ANDERSON, D. R.; BURNHAM, K. P. et al. **Introduction to distance sampling-estimating abundance of biological populations**. Oxford University Press. Oxford: 2001, 432 p.

BUNDY, J. G.; PATON, G. I; CAMPBELLA, C. D. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1149-1159, 2004.

BURRIS, R. Nitrogenases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n.15, p. 9339-9342, 1991.

BUYER, J. S.; ROBERTS, D. P. RUSSEK-COHEN, E. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 138-144, 1999.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov., na N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

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

CAMPBELL, C. J. O Brasil e o fim da era do petróleo. **Veja**. São Paulo, 20.12.2006.

CAMPÊLO, A. B.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Dexia* sp. Em solos de alguns estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 327-332, 1970.

CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. In.XIII Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, RELARE. **Anais**. Documentos 290. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Soja. Londrina, Paraná: p 89-123, 2007.

CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A .; ARAUJO, J. V. et al. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* ssp, submetidos a criopresevação. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 465-469, 2004.

CANHOS, V. C.; COUTINHO, H. L. C.; VAZOLLER, R. Micro-organismos e diversidade de solos. **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica**, versão de 28 de outubro de 1998.

CARVALHO, A. V.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Resposta do dendezeiro à adição de nitrogênio e sua influência na população de bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 293-300, 2006.

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A. et al. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 345, p. 155-169, 2011.

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

CERETTA, C. A.; PAVINATO, A.; PAVINATO, P. S. et al. Micronutrientes na soja: produtividade e análise econômica. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 576-581, 2005.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y. et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5437-5447, 2000.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J. et al. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p. 81-88, 2000.

CHAO, A.; LEE, S., M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal American Statistical Association**, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHAO, A.; SHEN, T. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. **Environmental and Ecological Statistics**, n. 4, v. 10, p. 429-443, 2003.

CHAREST, M. H.; BEAUCHAMP, C. J.; ANTOUN, H. Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p. 219-227, 2005.

CHÁVEZ, L. F.; ESCOBAR, L. F.; ANGHINONI, I. et al. Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 10, p. 1254-1261, 2011.

CHOUDHARY, D. K.; JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants-with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v. 164, n. 5, p. 493-513, 2009.

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

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A. et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1685-1693, 2005.

CONN, V. M.; FRANCO, M. M. F. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length polymorphism and sequencing of 16S rRNA Clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1787-1794, 2004.

COUTINHO H. L. C; OLIVEIRA V. M; MANFIO G. P. Diversidade microbiana em amostras ambientais. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Eds.). **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**, Editora Vozes, Petrópolis: p. 215-232. 2001.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 2, p. 273 - 281, 2004.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B. et al. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

da SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 213-231, 2003.

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

DAFFONCHIO, D.; BORIN, S.; FROVA, G. et al. PCR fingerprinting of whole genomes, the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveals a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 107-116, 1998.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C. et al. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbiology Ecology**, v. 38, n. 3, p. 273-284, 1999.

DALTON, D. A.; KRAMER, S. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In: S. S. Gnanamanickam (Ed.). **Plant-Associated Bacteria**. p. 105-130, 2006.

DEAN, R. D.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. Nitrogenase metallocluster: structure, organization and synthesis. **Journal Bacteriology**, v. 175, p. 6737, 1993.

de BARY, A. **Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien**. Wilhelm Engelmann, Leipzig: 1884, 558 p.

de SOUZA, J. T.; de BOER, M.; de WAARD, P. et al. Biochemical, genetic and zoosporicidal properties of cycling lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7161-7172, 2003.

DIAZ-ZORITA, M.; FERNANDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 3-11, 2009.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia**. Embrapa, seropédica, 1999.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter* em solos ácidos. **Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 1-36, 1953.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 357-365, 1966.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bactéria of the genus *Beijerinckia derx* in the rizhosphere of sugarcane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211-217, 1961.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. **Science Tech Publishers**, Springer-Verlag, 1987.

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

DOMMARGUES, Y.; DUHOUX, E.; DIEM, H. G. **Les Arbres fixateurs d'azote** - caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides. CIRAD, 1999. 499 p.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHOF, G. et al. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass Miscanthus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, Embrapa produção de informação, 2006. 412p.

ENRIGHT, M. C.; FENOLL, A.; GRIFFITHS, D. et al. The three major Spanish clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* are the most common clones recovered in recent cases of meningitis in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3210–3216, 1999.

FACTUR, V. D. **Fontes de fósforo associadas à adubação orgânica no plantio de cana-de-açúcar**. 2008. 26p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2008.

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B. dos; STONE, L. F. **Manejo de Nitrogênio em Arroz Irrigado**. Santo Antonio de Goiás: EMBRAPA – CNPAF, 4 p. 2003. (EMBRAPA – CNPAF. Circular Técnica 58).

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M. et al. Caracterização de variedades clonais *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotrópica**, v. 13, p. 79-86, 2001.

FALEIRO, F. G. **Marcadores Genético-Moleculares Aplicados a Programas de Conservação e Uso de Recursos Genéticos**, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007, 102 p.

FAO. **Lecture notes on the major soils of the world**. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2001, 337p. (World Soil Resource Report, 94).

FARJADO, S. Território paranaense: aspectos da ocupação e formação da estrutura produtiva e as transformações da paisagem rural. **Guairacá**, n. 22, p. 95-117, 2006.

FENG, Y.; SHEN, D.; SONG, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 938-945, 2006.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes para as culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 911-920, 2003.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região da baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1509-1517, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**, Brasília, EMBRAPA, 1995, 220 p.

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

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo do que está por trás do que se vê**. 4. ed. Passo Fundo: UPF, 2008. 733p.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. B. et al. **Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola**. Comunicado Técnico. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agrobiologia. Seropédica, Rio de Janeiro: n.43, p 1-4, 2000.

FONTENELE, A. C. F.; ARAGÃO, W. M.; RANGEL, J. H. A. et al. Leguminosas tropicais: *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. uma forrageira promissora. **Revista Brasileira Agrociência**, v.15, n.1-4, p.121-123, 2009.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathology**, v. 23, p. 36-41, 1997.

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A. et al. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51 (Pt 4), p. 1305-1314, 2001.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A global census of nitrogenase diversity. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 1790-1799, 2011.

GAMA-RODRIGUES, E. F. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Eds.). **Fundamentos da matéria orgânica**, Porto Alegre, Gênese, p. 228-243, 1999.

GARBEVA, P.; van VEEN, J. A.; van ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

- GARBEVA, P.; van VEEN, J. A.; van ELSAS, J. D. Predominant *Bacillus* sp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. **Microbial Ecology**, v. 45, p. 302-316, 2003.
- GARCIA, J. A. L.; DOMENECH, J.; SANTAMARÍA, C. et al. Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n. 3, p. 239-251, 2004.
- GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2.ed. New York: The Williams e Wilkins/Springer-Verlag, 2001.
- GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L. et al. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty-three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.
- GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G. et al. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.
- GILLIS, M.; TRAN, V.; BARCIN, M. et al. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 274-289, 1995.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.
- GORIS, J.; DEVOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. et al. Classification of the biphenyl and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1677-1688, 2004.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology Biochemistry**, v. 39, p. 867-876, 2007.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.
- GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 369-378, 1998.
- GUTIÉRREZ MAÑERO, F. J.; PROBANZA, A.; RAMOS, B. et al. Effects of culture filtrates of rhizobacteria isolated from wild lupine seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, v. 26, n. 5, p. 1101-1115, 2003.
- HAICHAR, F. Z.; MAROL, C.; BERGE, O., et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, v. 2, p. 1221-1230, 2008.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, 2001.

HOWARTH, R.; ANDERSON, D.; CLOERN, J. et al. Nutrient pollution of coastal rivers, bays and seas. **Issues in Ecology**, v.7, p. 2-15, 2000.

HSU, S. F.; BUCKLEY, D. H. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. **International Society for Microbial Ecology**, v. 3, p. 124-136, 2009.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas de rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p. 339-364, 1994.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R., S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**, Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1994, 542p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L. et al. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brasil. **Biology and Fertility of Soils**, v.33, n.5, p.387-394, 2001a.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; COCA, R. G. et al. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1349-1361, 2001b.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.). **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**, Houston: Studium Press, LLC, p.43-93, 2006.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P. et al. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**, Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico 79).

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; CARTER, H. D. et al. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 169-178, 2005.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 10, p. 1078-85. 2004.

IPARDES, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Paraná em Números**. 2011. Disponível em: <[http://www.ipardes.gov.br/index.php?pg\\_conteudo=1&cod\\_conteudo=1](http://www.ipardes.gov.br/index.php?pg_conteudo=1&cod_conteudo=1)>. Acesso dia 25 de fev. 2012.

ISLAM, M. R.; SULTANA, T.; CHO, J. C. et al. Diversity of free-living nitrogen-fixing bacteria associated with Korean paddy fields. **Annals of Microbiology**, p. 1-8, 2012.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MANTHAN, N. et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 894-906, 2002.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTEZ-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A. et al. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3676-3683, 1997.

JONES, D. L.; DARRAH, P. R. Amino-acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 163, p. 1-12, 1994.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. et al. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under the no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 2, p. 210-220, 2006.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: inferences to improve soil quality. **Plant and Soil**, v. 338, p. 467-481, 2011.

KENNEDY, I. R.; PEREG-GERK, L. L.; WOOD, C. et al. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v. 194, p. 65-79, 1997.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, n. 140, p. 679-693, 1989.

KIM, H. B.; PARK, M. J.; YANG, H. C. et al. *Burkholderia ginsengisoli* sp. nov., a beta-glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2529-2533, 2006.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p. 389-397, 1994.

KIRCHHOF, G.; ECKET, B.; STOFFELS, M. et al. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.

KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5/6, p. 853-862, 1997.

KNEE, E. M.; GONG, F. C.; GAO, M. et al. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 775-784, 2001.

KOKALIS-BURELLE, N.; VAVRINA, C. S.; ROSKOPF, E. N. et al. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. **Plant and Soil**, v. 238, p. 257-266, 2002.

KORHONEN, T. K.; LAAKSO, T.; ROENKKOE, R. et al. In: HATTORI, I.; MARUYAMA, M. (Ed). **Recent advances in microbial ecology**, Tokio, Japan Scientific Societies Press, p. 192-195, 1989.

KRAUSE, A.; RAMAKUMAR, A.; BARTELS, D. et al. Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 385-391, 2006.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Santa Maria, 2006, 109p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LAMMEL, D. R. **Diversidade de Rizóbios em Florestas de Araucária no Estado de São Paulo**. Piracicaba, 2007, 116p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", 2007.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 535-543, 2002.

LADHA, J. K.; PATHAK, H.; KRUPNIK, T. J. et al. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retropects and prospects. **Advances in Agronomy**, v. 87, p. 85-156, 2005.

LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G. et al. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2449-2456, 1996.

LI, Q. C.; ALLEN, H. L.; WOLLUM, A. G. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 571-579, 2004.

LIMA, J. A.; NAHAS, E.; GOMES, A. C. Microbial populations and activities in sewage sludge and phosphate fertilizer-amended soil. **Applied and Soil Ecology**, v. 4, p. 75-82, 1996.

LIU, Y.; MI, G.; CHEN, F. et al. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. **Plant Science**, v.167, p. 217-223, 2004.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOREAU, M.; NAEEM, S.; INCHAUSTI, P. et al. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. **Science**, v. 294, p. 804-808, 2001.

LOREDO-OSTI, C.; LÓPEZ-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. **TERRA Latinoamericana**, v. 22, p. 225-239, 2004.

LOURENTE, E. R. P.; MERCANTE, F. M.; ALOVISI, A. M. T. et al. Atributos Microbiológicos, Químicos e Físicos de Solo sob Diferentes Sistemas de Manejo e Condições de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 20-28, 2011.

LOUWS, F. J.; BELL, J.; MEDINA-MORA, C. M. et al. *rep*-PCR-mediated genomic fingerprint: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. **Phytopathology**, v. 88, p. 862-868, 1998.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G. V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 461-490, 2001.

LUPWAYI, N. Z.; CLAYTON, G. W.; HANSON, K. G. et al. Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 84, p. 37-45, 2004.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21, p. 157-165, 2007.

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S; GARIBALDI, R. et al. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e Rizóbio. **Ciência e Natura**, v. 33, p. 111-126, 2011.

MAGALHÃES, F. M. M. Nitrogen-fixing bacteria isolated from diverse soils and grass roots in Amazonia. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. (Ed.). **Associative N<sub>2</sub> Fixation**, Franklin Book Company, p. 37-46, 1981.

MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v. 15, n. 4, p. 246-252, 1984.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de Bactérias Endofíticas em cana-de-açúcar**. Curitiba, 2005, 93 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetic and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**, 2nd edn. Blackwell, Oxford, 2004.

MAHUKA, G. S.; JARA, C.; HENRIQUEZ, M. A. et al. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli and

*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by *rep*-PCR and PCR-RFLP of the ribosomal genes. **Journal of Phytopathology**, v.154, p. 35-44, 2006.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição Mineral de Plantas**, São Paulo: Agronomica Ceres Ltda. 2006, 251 p.

MARSCHNER, P.; YANG, C. H.; LIEBEREI, R. et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1437-1445, 2001.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, v. 283, p. 11-24, 2006.

MARK, G. L.; DOW, J. M.; KIELY, P. D. et al. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, p. 17454-17459, 2005.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R. et al. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 489-503, 2007.

MARTYNIUK, S.; WAGNER, G. H. Quantitative and qualitative examination of soil microflora associated with different management systems. **Soil Science**, v. 125, p. 343-350, 1978.

MARX, J. The roots of plant-microbe collaborations. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 234-206, 2004.

MCCARTNEY, L.; STEELE-KING, C. G.; JORDAN, E. et al. Cell wall pectic (1→4)-D-galactan marks the acceleration of cell elongation in the *Arabidopsis* seedling root meristem. **Plant Journal**, v. 33, p. 447-454, 2003.

McCLUNG, C. R.; PATRIQUIN, D. G. Isolation of a nitrogen-fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 6, p. 881-886, 1980.

McCLUNG, C. R.; PATRIQUIN, D. G.; DAVIS, R. E. *Campylobacter nitrofigilis* sp.nov., a nitrogenfixing bacterium associated with roots of *Spartia alterniflora* Loisel. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, p. 605-612, 1983.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogenfixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007b.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita , em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 85-93, 2004.

MELLONI, R., ABRAHÃO, R. S., MOREIRA, F. M. S. et al. Impacto de resíduo de siderurgia na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 24, p. 309-315, 2000.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B. **Micro-organismos do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/188/>>. Acesso em: 11 jun. 2010.

MENDES, I. de C.; REIS JUNIOR, F. B. d. **Uso de parâmetros microbiológicos como indicadores para avaliar a qualidade do solo e a sustentabilidade dos agroecossistemas**. Planaltina, DF., p.1517-5111, 2004. (Documento 112, Embrapa cerrado)

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of 16S rRNA, ITS, glnII, recA, atpD and dnaK genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 2934-2950, 2009a.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, n.4, p.315-32, 2006.

MENNA, P.; PEREIRA, A. A.; BANGEL, E. V. et al. *rep*-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 120-130, 2009b.

MERCANTE, F. M.; da SILVA, R. F.; FRANCELINO, C. S. F. et al. Biomassa microbiana, em um ARGISSOLO VERMELHO, em diferentes coberturas vegetais, em área cultivada com mandioca. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 4, p. 479-485, 2008.

MICHÉ, L.; BATTISTONI, F.; GEMMER, S. et al. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 502-511, 2006.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F. et al. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 105-114, 2003.

MOON, C. D.; GIDDENS, S. R.; ZHANG, X. X. et al. Molecular mechanisms underpinning plant colonization by a plant growth-promoting rhizobacterium. Cap. 6, p. 111-128. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (ed). **Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth**, 2008, 310 p.

MOORE, F. P.; BARAC, T.; BORREMANS, B. et al. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 539-556, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O. et al. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais. Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 749-781, 2008.

- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**, 2<sup>a</sup> ed. UFLA, Lavras, Brasil. 2006, 729 p.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. Revisão. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- MORTON, C. O.; MAUCLINE, T. H.; KERRY, B. R. et al. PCR-based fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, v. 107, p. 198-205, 2003.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G. et al. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 277-86. 2005.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S. et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus* ), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 137-145, 2002.
- NATURAL, M. P.; LANDO, L. A. D.; JOVER, E. M. Variability of the potato bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi et al., in the Philippines. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. St. Paul: APS Press, p. 493-499, 2005.
- NEAL, J. L.; LARSON, R. I. Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, p. 151-155, 1976.
- NEHL, D. B.; KNOX, O. G. G. Significance of bacteria in the rhizosphere, cap. 6. In: MUKERJI, K. G.; MANOHARACHARY, C.; SINGH, J. (Ed.). **Microbial Activity in the Rhizosphere**. Soil Biology, v. 7, p. 89-119, 2006.
- NERONI, R. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, v. 64, p. 303-304, 2007.
- NEUMANN, G; TERAS, R; MONSON, L.; KIVISAAR, M; SCHAUER, F.; HEIPIEPER, H.J. Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: effects of toxicity and adaptation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 1907-1912, 2004.
- NEVES, M. C. P.; RUMJANEKN, G. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, cap. 1, p. 15-60, 1998.
- NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E. (eds.) **Nitrogen Fixation: From Molecules To Crop Productivity**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.
- NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. et al. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 269 -279, 2004.

NOURI, S.; BAHAR, M.; FEGAN, M. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. **Plant Pathology**, v. 58, p. 243-249, 2009.

OLIVEIRA, A. D.; CANUTO, E. D. L.; URQUIAGA, S. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1, p. 23-32, 2006b.

OLIVEIRA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A. et al. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1473-1482, 2009.

OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Burning cane: the long term effects. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 272-275, 1994.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. Construindo a história dos produtos naturais. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-19, 2006a.

ORLANDO FILHO, J.; HAAG, H. P.; ZAMBELLO, E. Jr. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função da idade em solos do estado de São Paulo**. Boletim Técnico 2, Planalsucar, Piracicaba, SP: 1980, 128 p.

ORR, C. H.; JAMES, A.; LEIFERT, C. et al. Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 911-919, 2011.

OSORIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em lotus como promotores de crescimento em arroz irrigado**. Porto Alegre, 2009, 97p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, 2009.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3795-3801, 2002.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. et al. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* sp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, n. 2, p. 111-115, 1991.

PAYNE, G. W.; RAMETTEZ, A.; ROSE, H. L. et al. Application of a recA gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p.126-132, 2006.

PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25-35, 2008.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; et al. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PEREIRA, R. M. **Diversidade bacteriana de um latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**. Jaboticabal, 2003, 75 p. Dissertação, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G. et al. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1931-1937, 2006.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. Seropédica, 2007, 88p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

PEREIRA, G. V. M.; MAGALHÃES, K. T.; LORENZETTI, E. R. et al. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 405-417, 2012.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 180-201, 2000.

PIERIK, R.; THOLEN, D.; POORTER, H. et al. The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 4, p. 176-183, 2006.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1851-1864, 2007.

PONTES, A. C. F. **Análise de Variância Multivariada com a Utilização de Testes não Paramétricos e Componentes Principais Baseados em Matrizes de Postos**. Piracicaba, 2005, 106 p. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”. Universidade de São Paulo, 2005.

POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. **Cambridge University Press**, p. 201-241, 1982.

PRADO, R. M. **Manual de nutrição de plantas forrageiras**, 2009. Disponível em: [http://www.nutricaoeplantas.org.br/site/downloads/sumula\\_livro\\_nutricaoforrageira.pdf](http://www.nutricaoeplantas.org.br/site/downloads/sumula_livro_nutricaoforrageira.pdf). Acesso dia 22 de setembro de 2010.

PRAYITNO, J.; ROLFE, B. Characterization of endophytic diazotroph bacteria isolated from rice. **HAYTI Journal of Biosciences**, v. 17, n. 2, p. 73-78, 2010.

RADEMAKER, J. L.; DE BRUJIN, F. J. **Characterization and classification of microbes by *rep*-PCR genomic fingerprint and computer-assisted pattern analysis**. 2000. Disponível em: <http://www.msu.edu/asci/debrujin/dna.htm>.

RAMOS, D. P.; REGO FILHO, L. M. Pedologia e interpretações para o manejo e a conservação do solo e da água. In: ANDRADE, A. G.; PRADO, R. B.; TURETTA, A. P. D. **Manejo e Conservação do Solo e da Água no Contexto das Mudanças Ambientais**. Rio de Janeiro, 2010, 486p.

RAO, N. S. S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 863-866, 1983.

REDDY, P. M.; LADHA, J. K.; SO, R. B. Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. **Plant Soil**, v. 194, p. 81-98, 1997.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. et al. *Azospirillum halopraeferes* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Organism Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 1, p. 43-51, 1987.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M. et al. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing protobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 574-584, 1993.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C. **Biomassa microbiana do solo**. Documentos 205. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Cerrados. Planaltina, DF: 40 p., 2007. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111: 205)

REIS JUNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Fixação Biológica do Nitrogênio associada a pastagem de braquiária e outras gramíneas forrageiras**. Documentos 52. ISSN 1517-5111, dezembro de 2002.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S. J. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing , plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006, 34 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 216).

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

REJESUS, R. M.; HORNBAKER, R. H. Economic and environmental evaluation of alternative pollution-reducing nitrogen management practices in central Illinois. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 75, p. 41-53, 1999.

REZENDE, M. O. O.; ROSA, R. S.; MESSIAS, R. A. et al. **Importância da compreensão dos ciclos biogeoquímicos para o desenvolvimento sustentável**. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos: 2003, 52 p.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L. et al. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* strains microsymbionts of common beans (*Phaseolus vulgaris*) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 297-306, 2009.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J. M.; MCNEILL, A. M. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, p. 305-339, 2009.

ROBSON, R. L.; POSTGATE, J. R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, p. 183-207, 1980.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

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

ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. et al. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v. 302, n.1, p. 91-104, 2008.

ROJAS-TAPIAS, D. F.; BONILLA, R. R.; DUSSÁN, J. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria on growth and copper uptake by sunflowers. **Water Air Soil Pollut**, v. 223, n. 2, p. 643-654, 2012.

ROSCOE, R.; BODDEY, R. M.; SLATON, J. C. Sistemas de manejo e matéria orgânica do solo. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F. B.; SALTON, J. C. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, p. 17-42, 2006.

RUSCHEL, A. P. **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar**. Piracicaba, 1975, 73 p. Tese, ESALQ/USP, 1975.

SACHS, I. A revolução energética do século XXI. **Estudos avançados**, v. 21, n.59, p. 21-38, 2007.

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

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactéria diazotróficas associadas a plantas não leguminosas. Capítulo 6, p. 97-115. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas, Instituto Agrônomo, 2007, 312 p.

SALAMONE, I. E. G.; SALVO, L. P.; ORTEGA, J. S. E. et al. Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. **Plant and Soil**, v. 336, p. 351-362, 2010.

SANTOS, P. E. L.; CRISTALES, R. B.; MELLADO, J. C. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixer with wide environmental geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 2, p. 215-222, 2002.

SCHLESINGER, W. H. **Biogeochemistry**: an analysis of global change. San Diego: Academic Press. 1997, 588 p.

SCHWAB, S. **Identificação e análise de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio**. Curitiba, 2006, 143p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná-UFPR, 2006.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M. HEULINB, T. et al. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 647-660, 2000.

SELDIN, L.; DUBNAU, D. DNA homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans* and other nitrogen fixing *Bacillus* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 151-154, 1985.

SELDIN, L.; van ELSAS, D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 451-456, 1984.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U. et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p. 23-32, 2002.

SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 155-159, 2006.

SHAHAROONA, B.; NAVEED, M.; ARSHAD, M. et al. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonas* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n.1, p. 147-155, 2008.

SHARMA, A.; PATHAK, A.; SAHGAL, M. et al. Molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria that enhance peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in chile (*Capsicum annuum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 483-494, 2007.

SHARMA, S.; SHARMA, S.; SINGH, R. et al. Colonization behavior of bacterium *Burkholderia cepacia* inside the *Oryza sativa* roots visualized using green fluorescent protein reporter. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1169-1175, 2008.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University Illinois Press, 1949, 117 p.

SHU, W.; PABLO, G. P.; JUN, Y. et al. Abundance and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere and bulk paddy soil under different duration of organic management. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 493-503, 2012.

SILVA, A. P.; BABUJIA, L. C.; FRANCHINI, J. C. et al. Microbial biomass under various soil- and crop-management systems in short and long-term experiments in Brazil. **Field Crops Research**, v. 119, p. 20-26, 2010.

SILVA, P.; NAHAS, E. Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 304-310, 2002.

SILVA, K. **Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica**. Lavras. 2006. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade federal de Lavras - UFLA, Brasil. 2006.

SILVA, M. C. P. **Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha***. Piracicaba, 2010, 79p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Microbiologia agrícola). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, 2010.

SOARES, R. A.; ROESCH, L. F. W.; ZANATTA, G. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, v. 33, p. 221-234, 2006.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v. 312, n.1, p. 15-23, 2008.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1043-1047, 2002.

STALEY, J. **Microbial Diversity and the Biosphere**. 1998. Disponível em: <http://www.bdt.org.br/oea/sib/staley>.

STATSOFT. **Statistica for Windows**, versão 5.0, 1995. (Software estatístico)

STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M.; MIEDZINSKA, K. et al. The variable part of the dnaK gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related *alpha* *Proteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.483-494, 2003.

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P. dos; VARGAS, V. P. et al. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1107-1120, 2008.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999, 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 93).

- TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, Porto Alegre: Artmed. 2009, 848 p.
- TANG, S. Y.; HARA, S.; MELLING, L. et al. *Burkholderia vietnamiensis* isolated from root tissues of Nipa Palm (*Nypa fruticans*) in Sarawak, Malaysia, proved to be its major endophytic nitrogen-fixing bacterium. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 9, p. 1972-1975, 2010.
- TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T. et al. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, v. 39, p. 49-55, 2000.
- TEJERA, N.; LLUNCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V. et al. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 270, p. 223-232, 2005.
- THEODORO, V. C. A.; ALVARENGA, M. I. N.; GUIMARÃES, R. J. et al. Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solo sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. **Acta Scientiarum**.v. 25, n. 1, p. 147-153, 2003.
- TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Micro-organismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V.V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F. et al. (Eds). **Tópicos em ciência do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2, p.195-276, 2002.
- TYSON, G. W.; BANFIELD, J. F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 411-415, 2005.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.
- URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Análise Quantitativa e Distribuição de Populações de Espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2005.
- UTKHEDE, R. S.; KOCH, C. A.; MENZIES, J. G. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 21, n. 3, p. 265-271, 1999.
- VALVERDE, A.; VELÁZQUES, E.; GUTIÉRREZ, C. et al. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov, a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1979-1983, 2003.
- VAN BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p.729-734, 1999.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Review**, v. 60, p. 407-438, 1996.

- VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biology control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp.strain WCS417r. **Phytopatology**, v. 91, p. 728-734, 1991.
- VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 118-124, 2008.
- VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P. et al. The Genetic Diversity of Culturable Nitrogen-Fixing Bacteria in the Rhizosphere of Wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 277-285, 2011.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**, Oxford: Blackwell, 164p, 1970.
- VON DER WEID, I.; DUARTE, G. F.; VAN ELSAS, J. D. et al. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2147- 2153, 2002.
- WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, p. 103-113, 1999.
- WEBSTER, G.; GOUGH, C.; VASSE, J. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant Soil**, v. 194, p. 115-122, 1997.
- WEISBURG, W.G.; BARNES, S.M.; PELLETIER, D.A. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.
- WENDLING, A. **Recomendação de nitrogênio para trigo e milho sob sistema plantio direto para o Paraguai**. Santa Maria, 2005, 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. 2005.
- WIELAND, G.; NEUMANN, R.; BACKHAUS, H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5849-5854, 2001.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organism: proposal for the domains Archea, Bateria and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 87, n. 12 , p. 4576-4579, 1990.

WOO, P. C. Y.; LAU, C. C. Y.; CHONG, K. T. K. et al. MP1 homologue-based multilocus sequence system for typing the pathogenic fungus *Penicillium marneffeii*: a novel approach using lineage-specific genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3647-3654, 2007.

XIE, G. H.; SU, B. L.; CUI, Z. J. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 38, p. 480-483, 1998.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

YANG, H. C.; IM, W. T.; KIM, K. K. et al. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 453-457, 2006.

YANG, H. X.; LIU, G. M.; ZHU, Y. L. et al. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 91-104, 2008.

YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant and Soil**, v. 336, p. 129-142, 2010.

YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; CORICH, V. et al. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, p. 99-114, 1997.

YOU, C. B.; ZHOU, F. Y.; ZHANG, D. D. et al. In: BOTHE, H.; BRUJIN, F. J.; NEWTON, W. E. (ed.) **Nitrogen fixation: Hundred years after**, Gustav Fisher, New York, USA: 1988, 802p.

YOU, I. D.; FUJII, T.; SANO, Y. et al. Dinitrogen fixation of rice *Klebsiella* associations. **Crop Science**, v. 26, p. 297-301, 1986.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 2271-2277, 1991.

ZEIGLER, D. R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1893-1900, 2003.

ZHANG, X.; NICK, G.; KAIJALAINEN, S. et al. Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in Sichuan. **China Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 378-386, 1999.

## **ANEXOS**

ANEXO A - Dendrograma construído a partir de caracterizações morfológicas (FONSECA et al., 2000) de 400 isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, obtido pela análise de agrupamento com o algoritmo ward e cálculo da distância euclidiana.

ANEXO B - Dendrograma construído com 269 isolados obtidos a partir de solos de diferentes classes e manejos de cultivo, juntamente a estirpes utilizadas como referência, obtido pela análise de agrupamento dos produtos de amplificação da reação por BOX-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

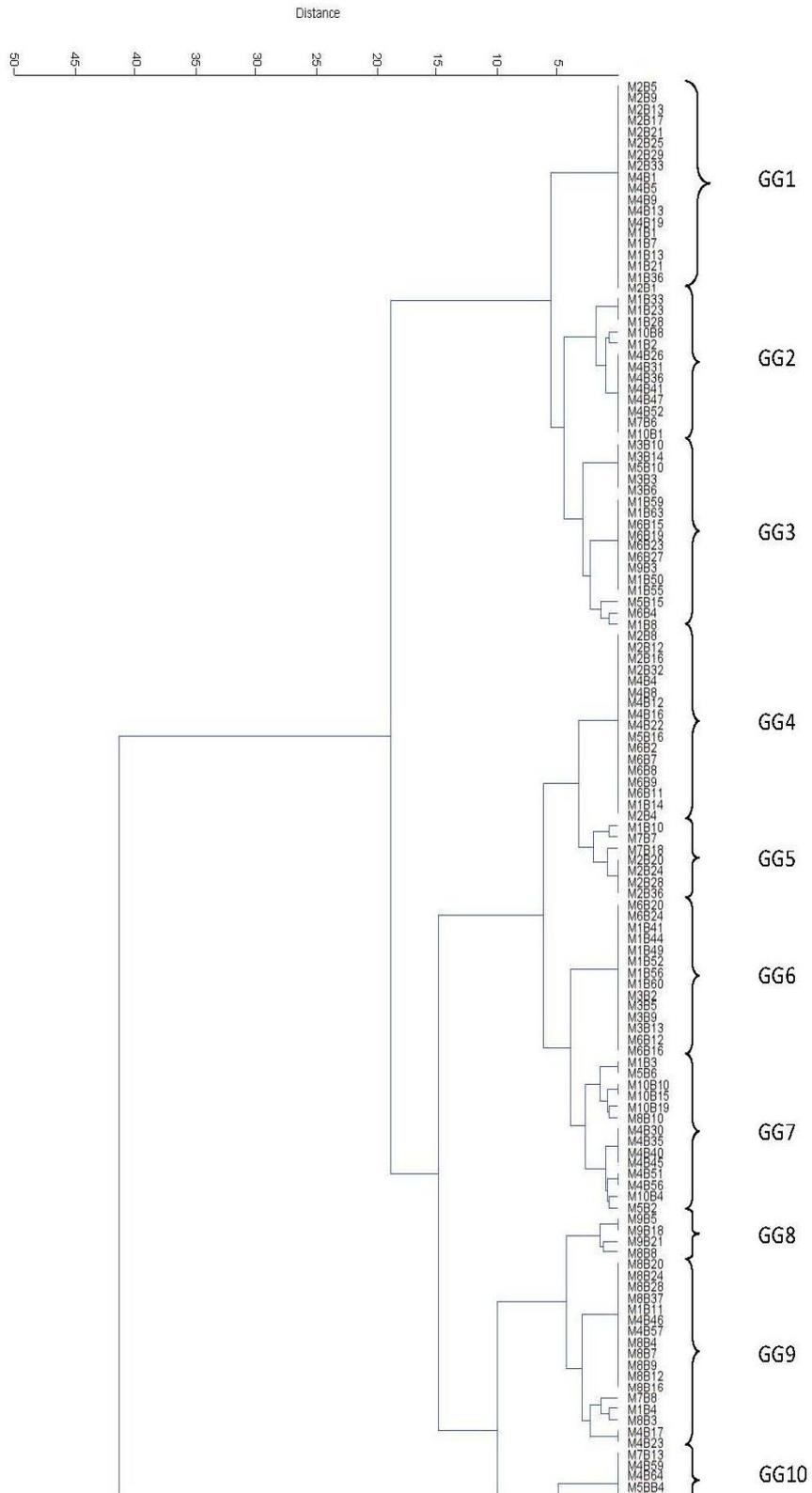
ANEXO C - Teste de média obtido para as variáveis unidades formadoras de colônias por placa (u. f. c.) e número de colônias morfológicamente diferentes.

ANEXO D - Análise de correlação entre classe de solo, manejo, região e características morfológicas dos isolados obtidos através da aplicação do coeficiente de Spearman.

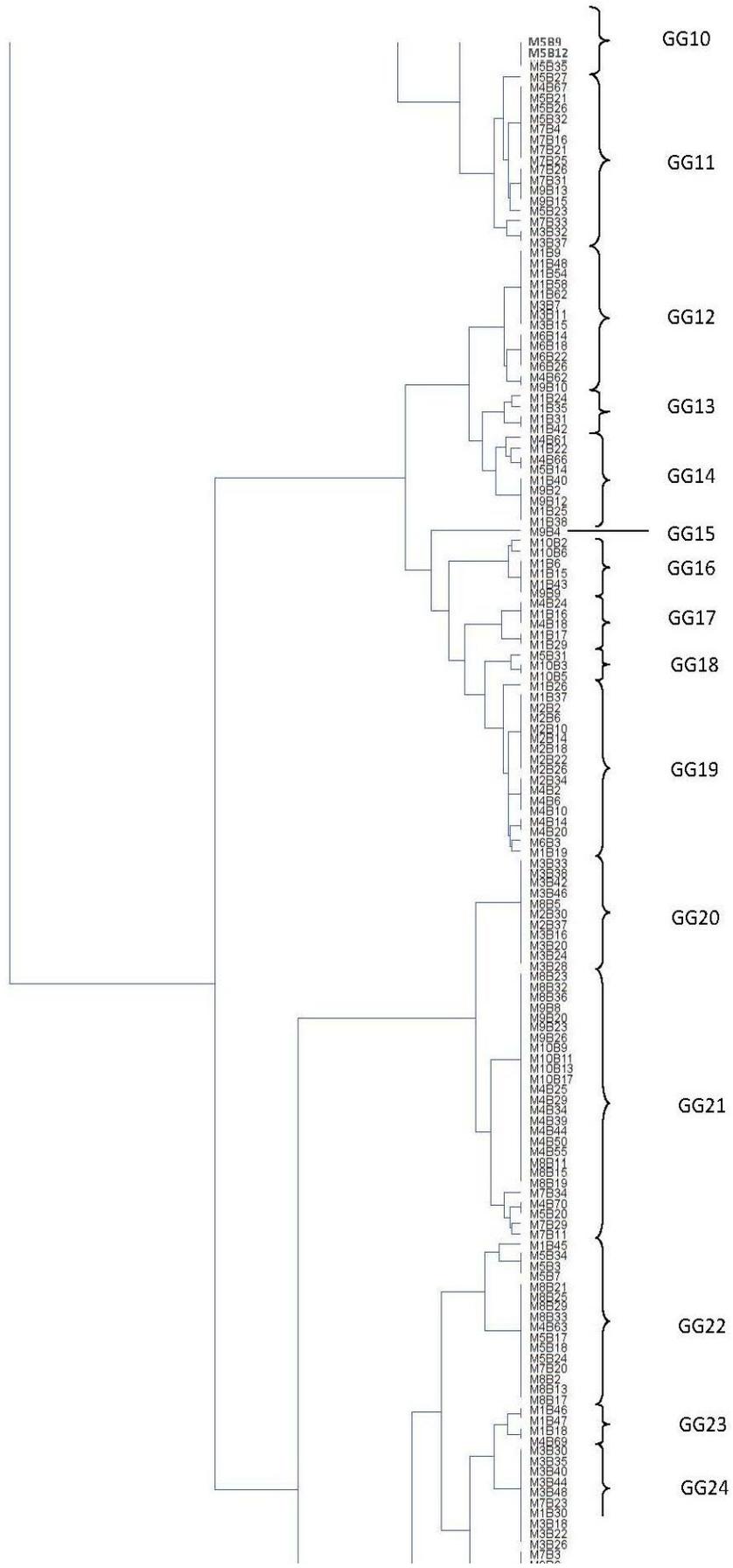
ANEXO E - Análise de correlação entre classe de solo, manejo, região e características genéticas dos isolados obtidos através da aplicação do coeficiente de Spearman.

ANEXO A - Dendrograma construído a partir de caracterizações morfológicas (FONSECA et al., 2000) de 400 isolados provenientes de áreas sob diferentes manejos, obtido pela análise de agrupamento com o algoritmo ward e cálculo da distância euclidiana.

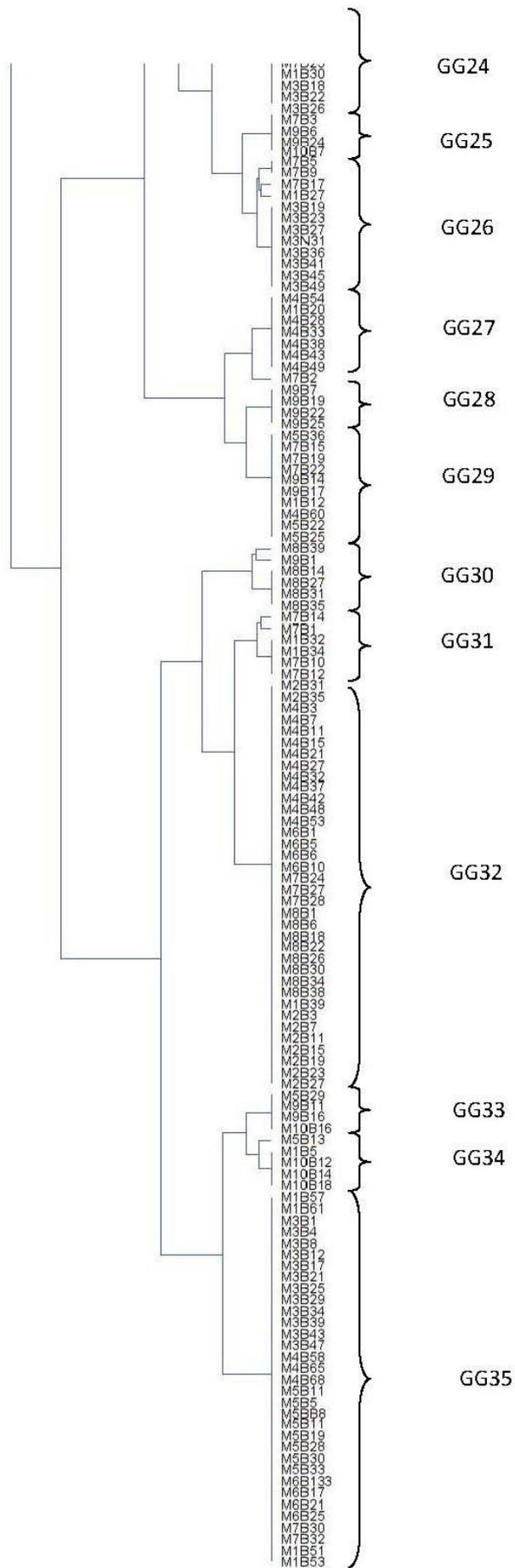
### Diversidade Morfológica



Continua...

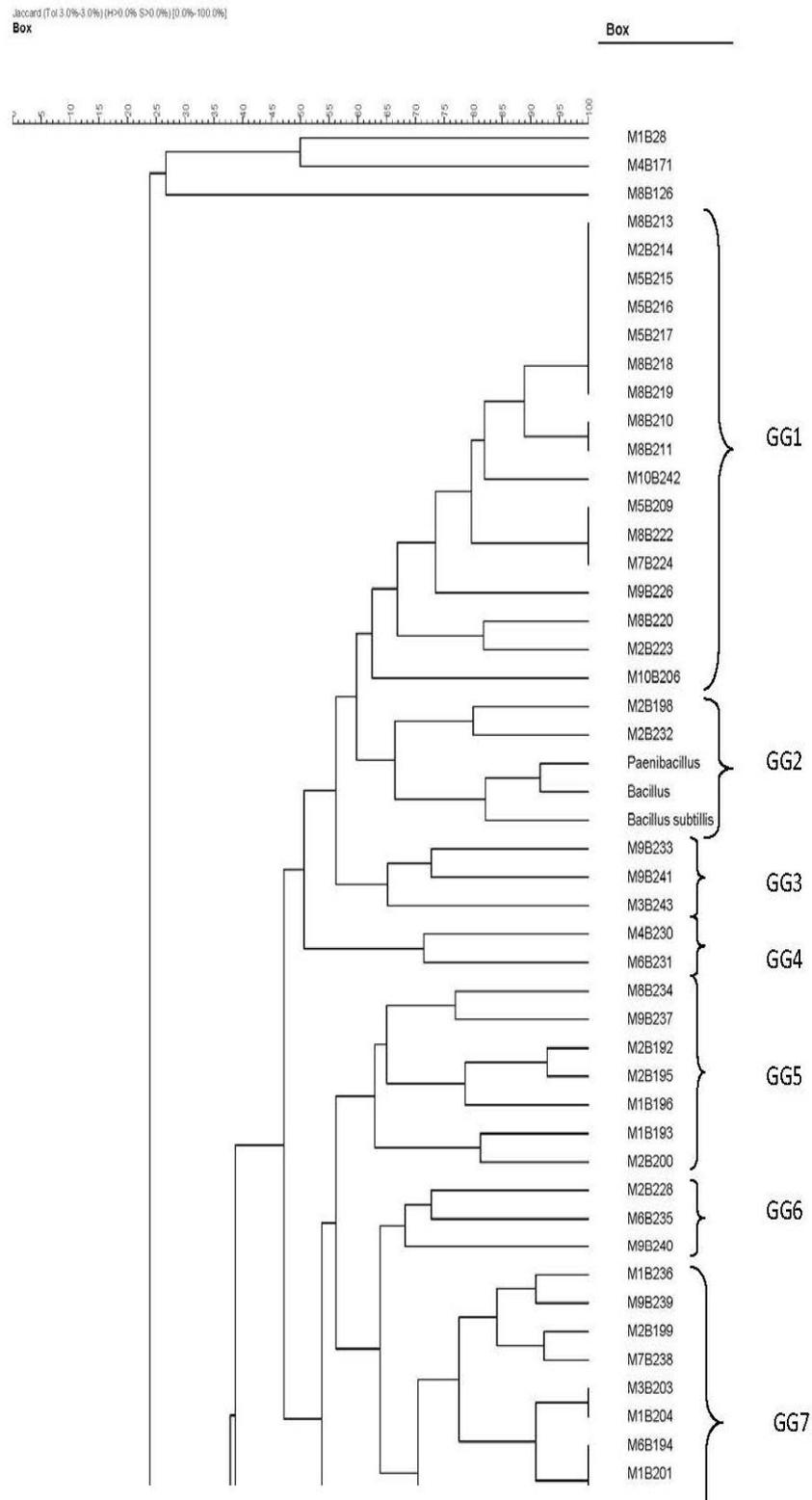


Continua...

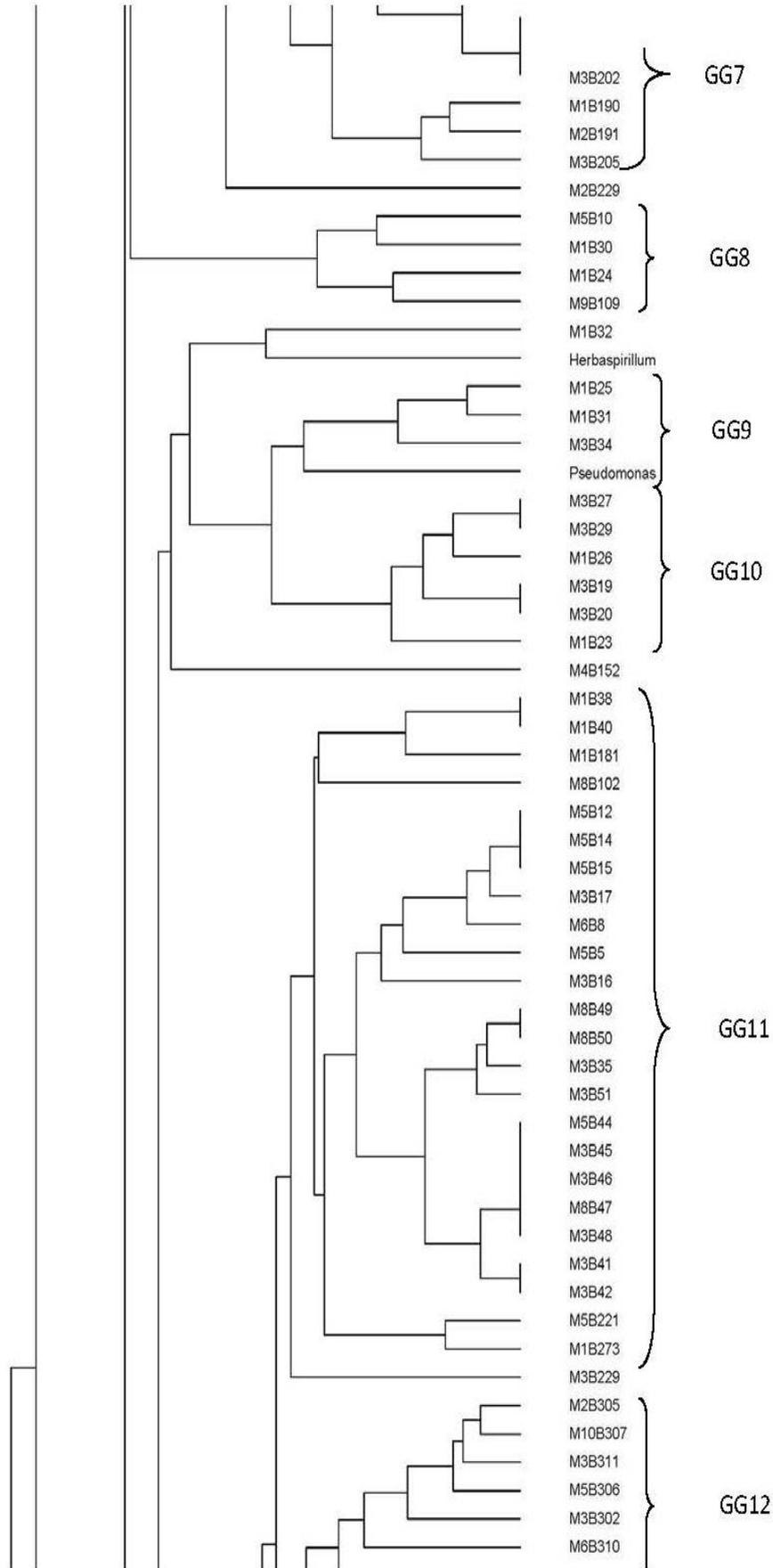


ANEXO B - Dendrograma construído com 269 isolados obtidos a partir de solos de diferentes classes e manejos de cultivo, juntamente a estirpes utilizadas como referência, obtido pela análise de agrupamento dos produtos de amplificação da reação por BOX-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

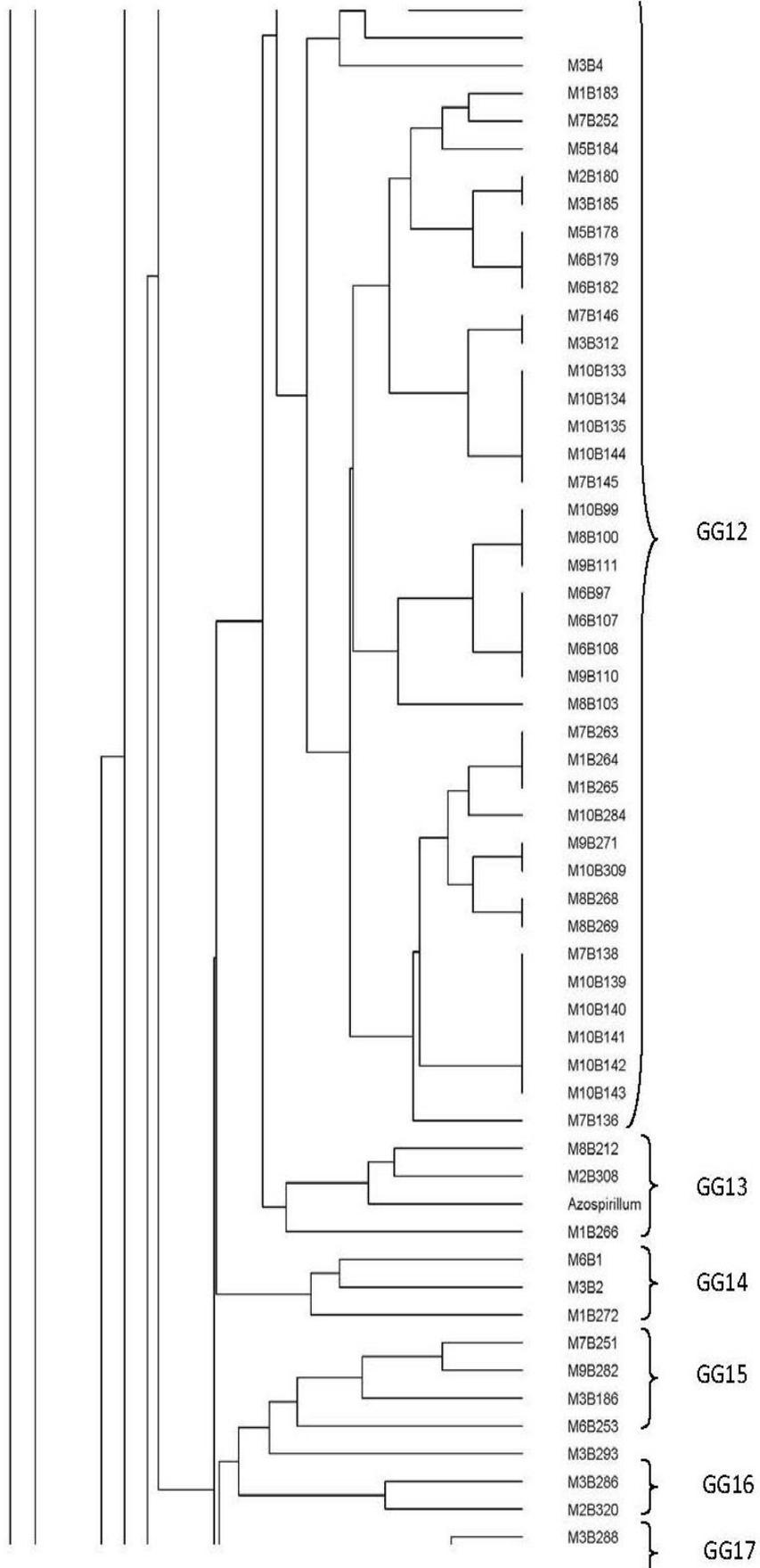
### Diversidade Genética



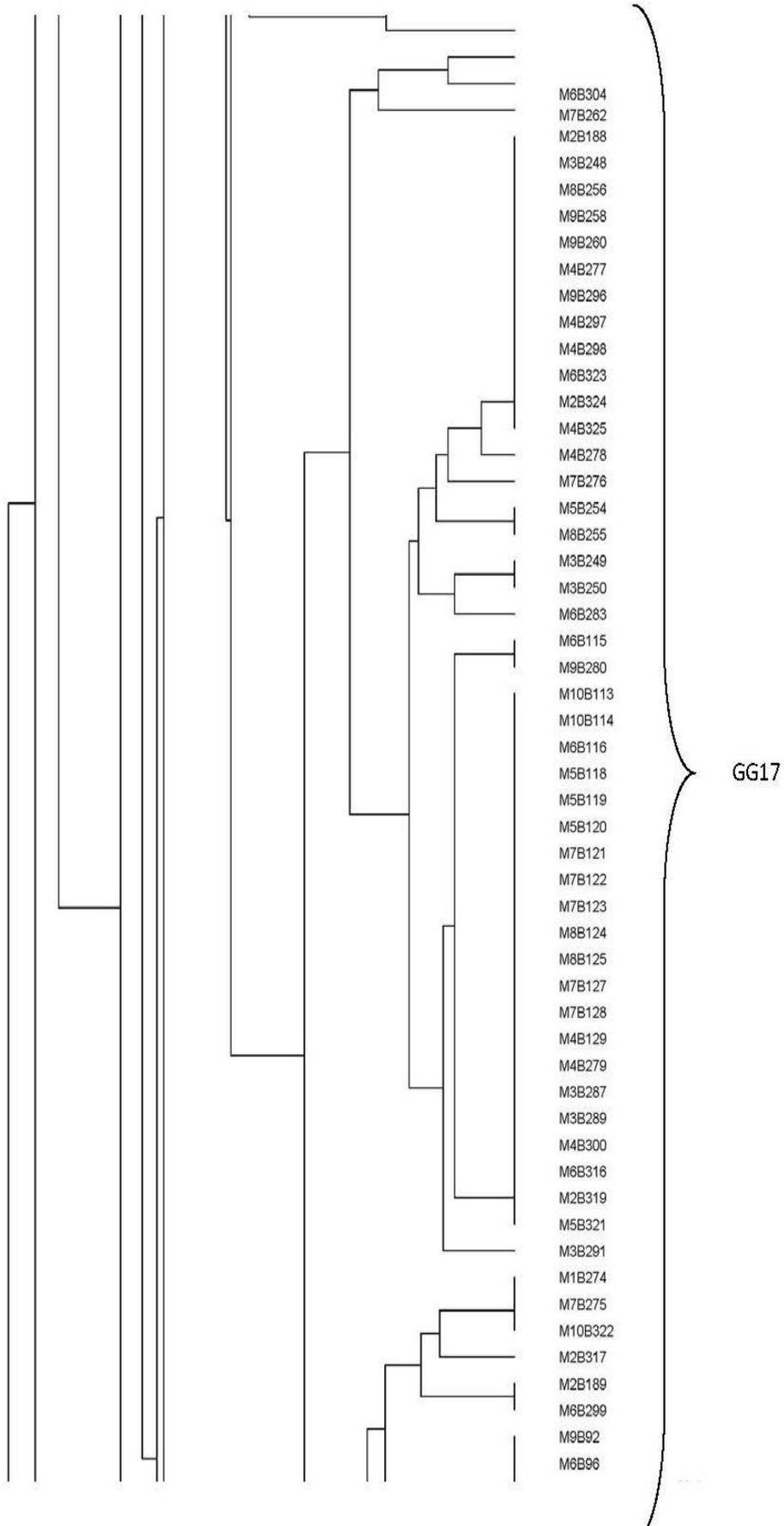
Continua...



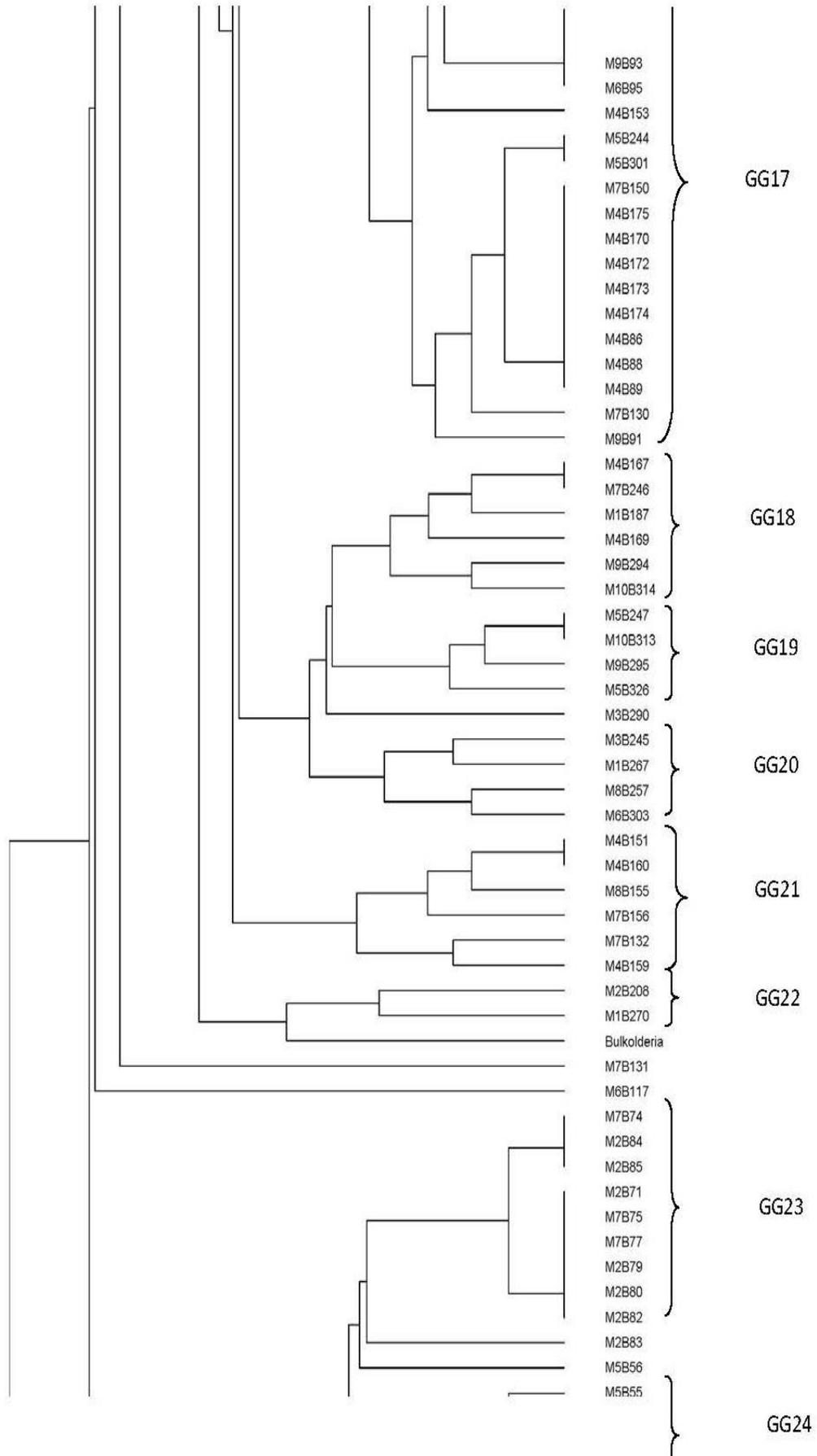
Continua...



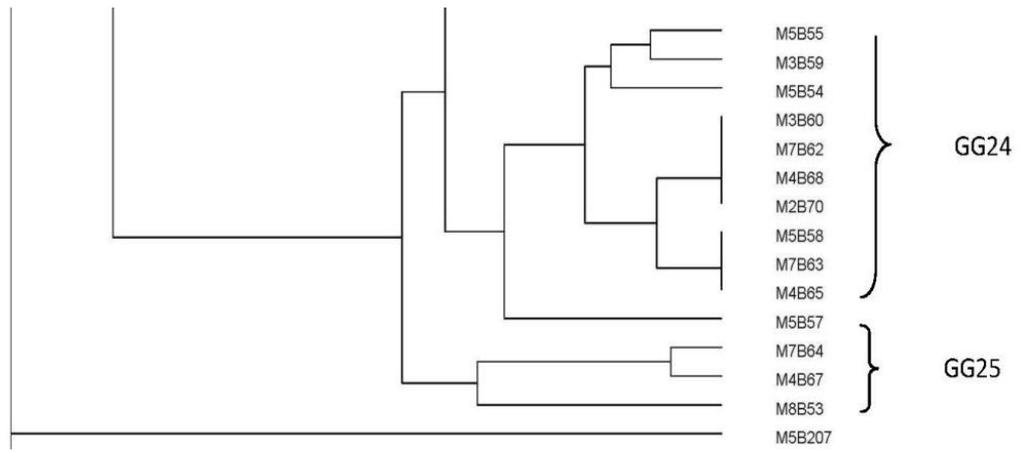
Continua...



Continua...



Continua...



ANEXO C - Teste de média obtido para as variáveis unidades formadoras de colônias por placa (u. f. c.) e número de colônias morfológicamente diferentes.

Variáveis	Nº de válidos	Média	Moda	Frequencia modal	Mínimo	Máximo	Variância	Desvio Padrão	Coefficiente de variação	Erro padrão	Skewness	Erro padrão	Curtose	Erro padrão
Número de colônias	120	178,18	0,000	9	0,00	600,00	22052,01	148,499	83,345	13,556*	1,631	0,221	2,454	0,438
Número de colônias diferentes	120	2,83	1,000	37	0,00	8,00	4,03	2,007	71,043	0,183*	0,587	0,221	-0,362	0,438

\* Correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ).

ANEXO D - Análise de correlação entre classe de solo, manejo, região e características morfológicas dos isolados obtidos através da aplicação do coeficiente de Spearman.

Variáveis	Média <sup>1</sup>	Desvio padrão	Manejo	Classe de solo	Região	Tamanho	Forma	Borda	Homogeneidade	Cor	Transparência	Elevação	Muco	Grupos
<b>Manejo</b>	104,99	2,88	1,000	0,535*	0,632*	0,082	0,206*	0,211*	0,083	0,107*	0,021	0,166*	0,238*	0,169*
<b>Classe de solo</b>	102,16	1,26	0,535*	1,000	0,653*	0,254*	0,131*	0,136*	0,023	0,051	0,012	0,493*	0,193*	0,156*
<b>Região</b>	102,20	0,59	0,631*	0,653*	1,000	0,222*	0,230*	0,216*	0,085	0,091	-0,020	0,308*	0,204*	0,164*
<b>Tamanho</b>	102,63	0,74	0,082	0,254*	0,222*	1,000	0,127*	0,156*	-0,013	0,014	-0,097	0,229*	0,052	0,061
<b>Forma</b>	102,08	0,28	0,205*	0,131*	0,230*	0,127*	1,000	0,885*	0,243*	-0,073	-0,152*	-0,010	-0,087	-0,093
<b>Borda</b>	102,09	0,30	0,210*	0,136*	0,216*	0,156*	0,885*	1,000	0,272*	-0,045	-0,083	0,090	-0,112*	-0,110*
<b>Homogeneidade</b>	102,33	0,48	0,083	0,023	0,085	-0,013	0,243*	0,272*	1,000	0,137*	0,657*	-0,245*	0,191*	0,401*
<b>Cor</b>	104,29	1,45	0,106*	0,051	0,091	0,014	-0,073	-0,045	0,137*	1,000	0,292*	-0,027	0,103*	0,714*
<b>Transparência</b>	102,25	0,44	0,020	0,012	-0,020	-0,097	-0,152*	-0,083	0,657*	0,292*	1,000	-0,172*	0,264*	0,574*
<b>Elevação</b>	102,34	0,48	0,166*	0,493*	0,308*	0,229*	-0,009	0,090	-0,245*	-0,027	-0,172*	1,000	0,169*	0,006
<b>Muco</b>	103,38	0,91	0,238*	0,193*	0,204*	0,052	-0,086	-0,112*	0,191*	0,103*	0,264*	0,169*	1,000	0,516*
<b>Grupos</b>	118,74	11,46	0,169*	0,156*	0,164*	0,061	-0,093	-0,110*	0,401*	0,714*	0,574*	0,006	0,516*	1,000

\* Correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ); <sup>1</sup> número de observações (N = 400).

ANEXO E - Análise de correlação entre classe de solo, manejo, região e características genéticas dos isolados obtidos através da aplicação do coeficiente de Spearman.

<b>Variável</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Manejo</b>	<b>Classe de solo</b>	<b>Região</b>	<b>Grupo</b>
<b>Manejo</b>	105,48	2,891	1,000	-0,049	0,030	-0,006
<b>Classe de solo</b>	102,31	1,364	-0,049	1,000	0,541*	0,192*
<b>Região</b>	102,26	0,636	0,030	0,541*	1,000	-0,012
<b>Grupo</b>	113,41	6,024	-0,006	0,192*	-0,012	1,000

\* Correlação significativa ( $p \leq 0,05$ ); \*\* número de observações ( $N = 256$ ).