

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

ELISIANE INÊS DALL'ÓGLIO CHAVES

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE SOLOS DO OESTE
DO PARANÁ USANDO MILHO E TRIGO COMO PLANTA ISCA**

Marechal Cândido Rondon

2013

ELISIANE INÊS DALL'ÓGLIO CHAVES

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE SOLOS DO OESTE
DO PARANÁ USANDO MILHO E TRIGO COMO PLANTA ISCA**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.

Marechal Cândido Rondon

2013

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

C5l2d	Chaves, Elisiane Inês Dall'Óglio Diversidade de bactérias endofíticas obtidas de solos do Oeste do Paraná usando milho e trigo como planta isca / Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves. – Marechal Cândido Rondon, 2013. 130 p. Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães Coorientador: Prof. Dr. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2013. 1. Bactérias. 2. Milho - Cultivo. 3. Trigo - Cultivo. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título. CDD 22.ed. 632.32 CIP-NBR 12899
-------	---

Ficha catalográfica elaborada 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.



PARANÁ

GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Bióloga **ELISIANE INÊS DALL'ÓGLIO CHAVES**. Aos seis dias do mês de dezembro de 2013, às 14h, sob a presidência do Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Bióloga Elisiane Inês Dall'Óglio Chaves, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado, com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"DOUTORA EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos (Unioeste), Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo (UFPR – Palotina), Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz (UFPR - Curitiba), Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira (UEL) e Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).

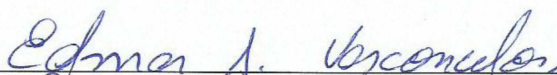
Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua tese, intitulada: **"Diversidade de bactéria endofítica obtidas de solos do Oeste do Paraná usando milho e trigo como planta isca"**.

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

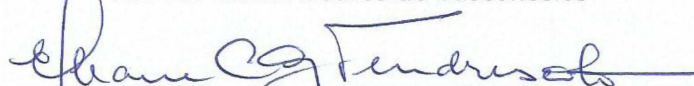
Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos.....	Aprovado
Prof. ^a Dr. ^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.....	Aprovado
Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz.....	Aprovado
Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira.....	Aprovado
Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador).....	Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"DOUTORA 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, 06 de dezembro de 2013.



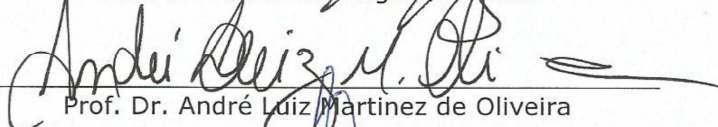
Prof. Dr. Edmar Soares de Vasconcelos



Prof.^a Dr.^a Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo



Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz



Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira



Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães (Orientador)

*Dedico a Deus sobre todas as coisas, ao
meu amado marido Uriel Chaves, ao
meu filho Felipe Dall`Óglio Chaves
e a minha mãe Alice Dall`Óglio,
por toda força e apoio
que me deram
para chegar
até aqui.*

AGRADECIMENTOS

"O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução". Pv 1:7

Chegou o momento mais importante de todo este trabalho, momento de reconhecer e agradecer a Deus, a Jesus Cristo, ao Espírito Santo e as pessoas que me ajudaram nesta árdua jornada. Com toda certeza sozinha não teria conseguido.

*Agradeço a **Deus**, meu Senhor, em quem confio integralmente, por ter me dado a salvação em Cristo **Jesus**, de ter todos os dias seu **Espírito Santo**, consolador me encorajando. Sem Eles teria desistido, por que as lutas foram muitas. Por todas as bênçãos que me concedeu, por tua orientação nas decisões, pelo sustento na dificuldade e por atender minhas orações ao seu tempo.*

*Ao meu amado marido **Uriel Ruela Chaves**, por ser meu companheiro e amigo em todos os momentos, tenham sido eles alegres ou tristes você não abriu mão de fazer sua parte. Seu apoio, compreensão e amor fizeram toda a diferença para que este trabalho fosse concluído. Obrigada por cuidar com tanto zelo e amor de mim na gestação e no pós-parto, e de nosso filho, principalmente em momentos em que não pude estar presente.*

*Ao meu filho **Felipe Dall'Óglio Chaves** meu presente de Deus, você iniciou comigo ainda no ventre esta longa jornada de quatro anos. Em momentos que pensei em desistir pela culpa de não estar contigo, no mesmo momento olhar para você me dava forças, por pensar no seu futuro. Seu lindo sorriso e abraço quando voltava para casa, me mostrava sua compreensão e amor incondicional. E nessa reta final quando entendeu de forma sublime que era só uma fase e que passará e a mamãe ficará com você sem falar em doutorado. Obrigada meu filho você é uma bênção.*

*A minha mãe **Alice Barbara Cittadin Dall'Óglio** minha eterna gratidão, sem a senhora é fato não teria conseguido, seu apoio e amor incondicional por mim e pelo Felipe foi fundamental e imprescindível para que concluísse o doutorado. A senhora abdicou de tudo para estar ao meu lado desde o nascimento do meu filho e não desistiu de mim, mesmo nos piores momentos. Deu-me apoio e ânimo a cada manhã, dizendo com toda sua experiência de vida "filha você vai vencer, isso vai passar". O teu cuidado e as tuas orações fizeram a diferença.*

*Ao meu pai **Luiz Antônio Dall'Óglio**, pelo amor, compreensão e apoio em todo o tempo, ao meu irmão **Éder Dall'Óglio** e a minha cunhada **Susamar Bell'Aver Dall'Óglio**, pelo carinho e apoio principalmente me ajudando a realizar o treinamento inicial para a tese em Londrina. Aos meus sogros **Orcélia** e **Sidnei Chaves** por toda ajuda, carinho e compreensão que sempre tiveram por mim. Por me ajudar muitas e muitas vezes, principalmente com o Felipe. Aos meus cunhados **Patrícia** e **Reginaldo Chaves** e meus amados sobrinhos **Renan** e **Gabriel Chaves** por todo carinho e apoio que me deram, seja no empréstimo do carro, no cuidar do Felipe, nas orações ou no convívio diário escutando os desabafos.*

*Aos meus cunhados **Evelyn** e **Marcelo da Costa** e meus queridos sobrinhos **Lucas** e **Daniel da Costa** que mesmo de longe se preocupavam e oravam por mim.*

*Aos meus tios **Ana Cristina** e **Valcir Paulo Cittadin**, e aos meus primos **Lucas**, **Gabriel** e **Isabella Cittadin**, pelas orações, pela ajuda e abrigo nas vezes em que estive em Curitiba, por seu cuidado e amor para comigo e com o meu filho.*

*A minha tia **Aldiva Sacks** pelo apoio, carinho e amor que sempre teve por mim.*

Ao meu orientador **Vandeir Francisco Guimarães** pela confiança, por ter me apresentado uma nova área de pesquisa que contribuiu significativamente para o meu crescimento como pesquisadora, por sua amizade e orientação.

A minha querida co-orientadora **Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo**, por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de te conhecer e trabalhar contigo. Obrigada por seu testemunho de vida, que em momentos importantes me incentivaram. Obrigada por sua amizade, carinho e principalmente compreensão. Creio que foi Deus que te colocou em minha vida, tenho a plena convicção que sem a sua ajuda e orientação eu não teria conseguido, minha eterna gratidão.

A professora **Marise Fonseca dos Santos** por tua confiança, amizade, ajuda e ensinamentos, que me fizeram crescer enquanto pesquisadora.

Ao professor **André Luiz Martinez de Oliveira** por ter me recebido com tanto carinho em Londrina para o treinamento na fase inicial da tese, por toda sua ajuda no decorrer do trabalho, sempre respondendo aos meus e-mails e me ensinando. Agradeço por contribuir com este trabalho em vários momentos e por ter aceito o convite para fazer parte da banca.

Ao professor **Leonardo Magalhães Cruz** por sua acolhida em Curitiba, nas muitas vezes em que estive lá, por toda ajuda na realização deste trabalho e por ter aceito o convite para fazer parte da banca.

Ao professor **Edmar Soares de Vasconcelos** por me ensinar a usar o programa genes, pela ajuda na realização da estatística e por sempre tirar minhas dúvidas, com muita paciência e atenção. Agradeço por ter aceito fazer parte da banca de qualificação e tese.

Ao professor **Cláudio Yuji Tsutsumi** por me aceitar como estagiária na disciplina de Genética e Melhoramento Vegetal e pela oportunidade de aprendizado.

Ao professor **Emanuel Maltempí de Souza** por me receber em Curitiba com tanta atenção e dispor de seu tempo para me ajudar, sou grata pela oportunidade de ter realizado o sequenciamento no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR Curitiba.

Aos todos os professores do Programa de Pós Graduação em Agronomia (PPGA) da UNIOESTE, pela oportunidade e aprendizado, de maneira muito especial aos professores **Cláudio Yuji Tsutsumi, Edmar Soares de Vasconcelos, José Renato Stangarlin, Márcia de Moraes Echer e Odair José Kuhn**, que me ajudaram além da sala de aula.

Aos professores **Suzana Stefanello e Adilson Ricken Schuelter** que contribuíram no início da minha formação acadêmica, por sempre torcerem por mim e apoiarem minha vida acadêmica.

Ao professor **Renato Tratch** Diretor da PUCPR Campus Toledo, por sua amizade, apoio, compreensão e ajuda em todo o percurso do doutorado, pelos conselhos e incentivos.

Ao professor **Sérgio Surugi de Siqueira** Decano da Escola de Saúde e Biociências da PUCPR, pelo incentivo e apoio para que terminasse o doutorado.

As pessoas maravilhosas que conheci e tive a oportunidade de trabalhar junto, aprender muito e que com certeza sem elas não seria possível a realização deste trabalho, a **Fernanda Freitas de Oliveira**, que esteve comigo desde o início, minha eterna gratidão por todo trabalho que desenvolveu de forma brilhante, por sua amizade, apoio em todos os momentos e por sua compreensão; a **Joel Antônio Cordeiro de Abreu** por seu comprometimento, amor ao trabalho, pela amizade e por sempre me ajudar; a **Maiara Pasuch Camargo** agradeço por fazer dos momentos de trabalho uma alegria e diversão, pelo apoio e por realizar com tanta dedicação e excelência as atividades; a **Vanessa Suzane Schneider** que com seu jeito meigo me ajudou e incentivou, você pegou o barco andando, mas conseguiu se superar e me ajudar muito .

Aos amigos **Fernando Furlan** e **Walkyria Neiverth** pela amizade, companheirismo, por sempre me ensinarem as práticas laboratoriais com tanta atenção, não medindo esforços para me ajudar.

Aos toda equipe LABIOGEN que passou um tempo no laboratório e me ajudaram de alguma maneira, seja auxiliando nas atividades, seja me apoiando e incentivando, **Andressa Estevam, Camila Gazola Volpiano, Carolini Stabach, Everton Ferreira, Jaina Caroline Lunkes, Kléber Saatkamp, Maik Wiest, Maiara Daga, Mariana Moresco Ludtke e Sarah Romani**, agradeço por terem feito deste tempo um convívio harmonioso.

Aos técnicos da UFPR, **Cleuza Aparecida da Rocha Montanucci, Éderson Marcelo Klein, Juliana Kafka Bilha, Mara Zadinello, Suziana Galli, Taiomara Butzke** pelo companheirismo, e principalmente por me dar suporte em tudo o que precisei.

A **Jamilson Bispo** pela ajuda na semeadura das culturas na cidade de Iporã, a **Jonas Vendrusculo** pela ajuda na coleta do solo em Iporã e ao professor **Milton Ferreira de Moraes** pela ajuda na análise e fertilidade do solo.

A todos que me ajudaram de alguma maneira enquanto estive no Campus Curitiba, agradeço o aprendizado e apoio, ao **Adriano A. Stefanello, Giovana S. Magnani, Liziane Brusamarello, Maria Isabel Stets, Michelle Z. T. Sfeir, Roseli Prado** e a **Valter Baura**.

À UFPR Campus Palotina e Curitiba, em especial ao LABIOGEN e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela concessão do Laboratório, infraestrutura e por possibilitar minha capacitação.

À COODETEC – Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, pela concessão dos materiais e apoio durante parte da pesquisa, e principalmente ao pesquisador **Ivan Schuster** por ceder o espaço do Laboratório de Biotecnologia para realização das análises e em especial as pesquisadoras **Fabiane Lazzari**, pela amizade, por ter gasto tempo comigo me ensinando e ajudando, sempre com muita paciência e carinho e a **Leandra Teixeira** pelo apoio.

As amigas maravilhosas que tive oportunidade de conhecer e que me ajudaram de maneira sempre carinhosa e eficiente com quem aprendi muito **Crisleine Thomann Predebon, Kheldy Wechwerth** e **Laura Christina Calgaro**.

Ao **Paulo Ricardo Franco Marcelino** pela oportunidade de te conhecer e por ter me ensinado muito no treinamento em Londrina, sua ajuda foi fundamental para o início deste trabalho, assim como a **Karita Reis** por tirar minhas dúvidas e me ajudar.

As minhas queridas alunas de iniciação científica da PUCPR Campus Toledo **Aline Kelly Pomini de Souza, Daniele Aline Portz e Katia Kabroski Andrioli**, pela amizade, apoio, ajuda sempre presente e compreensão, e a **Kelly Chapla** que ajudou no início do trabalho.

A todos os alunos dos cursos de Agronomia e Ciências Biológicas da PUCPR Campus Toledo em que ministrei aulas neste tempo de doutorado, pela compreensão e incentivo.

Aos laboratoristas da PUCPR Campus Toledo **Marciele Solera**, pela amizade e incentivo, a **Danielle Deicke, Débora Borth, Zélia Melato Alvez, José Domingos e Dario de Oliveira** que não mediram esforços para sempre me ajudar, e de maneira muito especial a **Taciara Cristina Mombach**, que não mediu esforços para me auxiliar em muitas análises sempre que precise.

À PUCPR Campus Toledo por todo incentivo e por ceder seu espaço para realização de muitas das atividades, e a todos os meus colegas de trabalho que me ajudaram.

A toda equipe da biblioteca em especial a **Kely Comin** pela amizade e ajuda na formatação do trabalho.

Ao **Alcione Feix** pela amizade e ajuda com o corew draw.

A **Gatlin Schulz** pelo carinho e por me ajudar com a língua inglesa.

Ao **Darci da Fontoura** meu querido amigo e parceiro de caminhada acadêmica, desde a graduação, mestrado e doutorado, pelas idas e vindas de Toledo/Rondon, por todo seu apoio, ajuda e pelas horas de estudos que me proporcionou ensinar e aprender. E sua esposa **Margarete da Fontoura** por sempre me receber com atenção e carinho.

Aos amigos que fiz na época de graduação e que continuam torcendo por mim e me apoiando, **Danielle Bueno Hasegawa, Nathielle Schumacher Bieger, Cláudia Olsen Philippsen** e **Jonas Byk**.

Aos colegas do PPGA pelo agradável convívio que oportunizou trocas de experiência, tanto de vida quanto de profissão, em especial **Cristiane C. Meiners, Jucenei F. Frandoloso, Artur Soares Pinto Junior, Norma Barbado, Edneia S. Oliveira, Emanuele Guandalin Dal'Maso, Fabiane C. Gusatto, Cristina F. Schneider, Vanessa Leonardo Ignácio, Leandro Rampim, Paulo Barbosa de Oliveira Filho, Andreia C. P. Rodrigues da Costa, Jeferson Klein** e **Karoline Bandeira**.

Aos amigos do Programa de Doutorado e de trabalho na PUCPR, **Clair Aparecida Viecelli, Jacir Daga, João Edson Kaefer** e **Valdemir Aleixo** o meu muito obrigada pelo apoio, convívio harmonioso e pela ajuda em muitos momentos.

As secretárias do PPGA **Celei Pletsch Martins** e **Leila D. Allievi Werlang** por resolver de maneira muito atenciosa e carinhosa todas as nossas demandas.

Aos meus queridos amigos de trabalho que me apoiaram durante todo este percurso, seja na licença maternidade, assumindo minha carga, seja na divisão de tarefas para meu fardo ficar mais leve, seja no escutar os desabafos e me apoiarem em todos os momentos, com muito carinho que agradeço a vocês **Michele Fernanda Bortolini, Luciana Alves Fogaça, Francielle Fiorentin, Aline Regina Limberger, Tatiana Orlandi, Adriana Dias Basseto, Geuza Cantanhêde da Silva, Marizete Gonçalves da Silva, Simoni Cristina Saling, Marcisnei Luiz Zimmermann, Alexandre Vogliotti, Rodrigo Campagnolo, Marcia de Holanda Nozaki, Jaime José Rauber, Domingos Vida Costa Filho, Ana Carla M Campos H. de Almeida** e aos demais professores do Campus Toledo e em especial ao colegiado do curso de Ciências Biológicas pelo trabalho maravilhoso que desempenharam neste tempo.

A todos os meus amigos e familiares que estiveram ao meu lado, torcendo e orando por mim, em especial ao Pr. **Roberto** e **Deila Welzel, Marilei Nunes, Suelaine da Costa**. E as queridas irmãs da REMAG minhas parceiras de oração.

A equipe médica que me acompanhou na gestação e no cuidado com meu filho, em especial a Dra. **Denise Wiggers** por sua amizade e todo cuidado que teve comigo, ao Dr. **João Pedro Pontes Câmara**, por seu carinho e atenção no cuidado com o Felipe, a **Sofia Sesti**, pela amizade e incentivo, ao Dr. **Fernando Roman**, pelo apoio e cuidado, a **Antoniela Rubert Thibes de Souza**, pelo cuidado com o Felipe e pelas orações.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao PPGA pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio a esta pesquisa.

E a todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada.

**"Tudo aquilo que conseguimos realizar
foi graças a ajuda de outras pessoas".**

Walt Disney

***“Meu Deus é bom pra mim,
Meu Deus é bom pra mim,
Comigo vai,
Tão forte brilha o sol
Que a chuva cai,
Amor tão grande assim,
Só Cristo tem por mim,
Direi até o fim,
Meu Deus é bom pra mim!”***
(Vaninha)

RESUMO

DALL'ÓGLIO-CHAVES, Elisiane Inês, D. S. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Dezembro de 2013. **Diversidade de bactérias endofíticas obtidas de solos do oeste do paraná usando milho e trigo como planta isca.** Orientador: Vandeir Francisco Guimarães. Coorientadora: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal constituem um amplo grupo de microrganismos, que associados às plantas representam um enorme potencial a ser explorado, por contribuírem benéficamente com o crescimento de várias espécies vegetais. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas obtidas de solos do oeste do Paraná, usando plantas de milho e trigo como iscas e avaliar o potencial dos isolados para a promoção do crescimento vegetal (PCV). Foram obtidos 136 isolados bacterianos provenientes de raízes de trigo e milho semeadas em três diferentes locais: área 1 (Argissolo vermelho), área 2 (Latosolo vermelho) e área 3 (Nitossolo vermelho). Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar fosfato insolúveis em meio NBRIP e quanto à capacidade de sintetizar auxina em meio DYGS. Oitenta e quatro estirpes bacterianas foram analisadas molecularmente através da análise de polimorfismo por ARDRA e 41 destas tiveram fragmentos do gene 16S rDNA sequenciados. A avaliação da capacidade de promoção de crescimento de seis dos isolados foi realizada *in vitro*, onde destes, dois isolados contrastantes foram avaliados quanto as suas performances em vaso. Como resultados obtidos, dos 136 isolados, 51% não apresentaram capacidade solubilizadora de fosfato, 14% apresentaram índice de solubilização de fosfato (ISF) baixo ($IS < 2$), 9,5% médio ($IS < 4$) e 25,5% alto ($IS \geq 4$), destacando-se o isolado UFPRPALM 3-66 (ISF 7,66). Os valores de AIA (ácido indol-3-acético) variaram entre 19,94 μg de AIA mg^{-1} de proteína (UFPRPALM1-134) a 1170,98 μg de AIA mg^{-1} de proteína (UFPRPALM 2-32), sem a adição de triptofano, e com adição de triptofano, apenas 42 isolados (31%) foram capazes de produzir AIA, sendo os níveis maiores variando de 362,18 (UFPRPALM 3-65) a 5599,57 (UFPRPALM 3-80) μg de AIA mg^{-1} de proteína. A análise de polimorfismo por ARDRA revelou 8 grupos bacterianos com 70% de dissimilaridade e apenas 8 isolados apresentaram perfil clonal. As sequências do gene 16S rDNA permitiu o agrupamento dos 41 isolados em oito grupos filogenéticos diferentes, entre estes estão as bactérias do gênero: *Agrobacterium*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ensifer*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Burkholderia*. Destes, foram escolhidos seis isolados produtores de AIA e solubilizadores de P que foram avaliados *in vitro* quanto a capacidade de crescimento. Neste experimento, dois isolados contrastantes foram caracterizados: UFPRPALM 3-87 (*Burkholderia ambifaria*), com maior e o UFPRPALM 1-14 (*Pantoea ananatis*), de menor capacidade de promoção de crescimento das plântulas de trigo *in vitro*, respectivamente. Em vaso, os isolados não apresentaram respostas de promoção de crescimento vegetal em solos de alta fertilidade, mas em condições de baixa fertilidade, o gênero *Pantoea* (UFPRPALM 1-14) foi o que apresentou a melhor performance em termos de aumentos dos teores de nitrogênio da parte aérea em trigo. Houve uma resposta diferencial dos isolados em termos de população microbiana epifítica e endofítica entre espécies vegetais e condições de fertilização e/ou inoculação.

Palavras-chave: ARDRA, sequenciamento, *Zea mays*, *Triticum*

ABSTRACT

DALL'ÓGLIO-CHAVES, Elisiane Inês, D. S. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, December de 2013. **Diversity of endophytic bacteria obtained of soils in western paraná using corn and wheat bait-plants.** Advisor: Vandeir Francisco Guimarães. Co-Advisor: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.

The plant growth promoting bacteria constitute a large group of plant associated microorganisms that has a huge potential to be explored for beneficial contribution in plant growing. In this context, the aim of this work was to study the diversity of endophytic bacteria obtained from soils in western Paraná, using plants such as wheat and corn baits and evaluate the potential of isolates to promote plant growth (PCV). A total of 136 endophytic bacteria isolates were obtained from roots in three different locations: area 1 (Argissolo vermelho), area 2 (Latosolo vermelho) and area 3 (Nitossolo vermelho). A total of 136 endophytic bacteria strains were isolated from roots in three different locations: area 1 (Argissolo vermelho), area 2 (Latosolo vermelho) and area 3 (Nitossolo vermelho). The isolates were evaluated for their ability to solubilize insoluble phosphate in NBRIP medium and also their ability to synthesize auxin in DYGS medium. Eighty-four bacterial strains were analyzed by molecular analysis of polymorphism by ARDRA and 41 of these fragments were sequenced 16S rDNA. Six isolates randomly chosen were evaluated according to their ability in promoting the plant growth *in vitro*, where from these, two contrasting isolates were evaluated for their performances in pots. As results for biochemical characterization, from 136 isolates, 51 % showed no phosphate solubilizing capacity, 14 % had a low level of phosphate solubilization index (ISF) low ($ISF < 2$), 9.5% medium ($ISF < 4$) and 25.5% higher ($ISF \geq 4$), the higher ISF was verified in UFPRPALM 3-66 (7.66). IAA (indole-3-acetic) values ranged from 19.94 (UFPRPALM1 -134) to 1170.98 mg IAA mg protein⁻¹ (UFPRPALM 2-32) without tryptophan addition and adding this aminoacid, only 42 strains (31%) were able to produce IAA in higher levels ranging from 362.18 (UFPRPALM 3-65) to 5599.57 (UFPRPALM 3-80) mg IAA mg protein⁻¹. The polymorphism analysis revealed by ARDRA bacterial 8 groups with 70% dissimilarity and only 8 isolates showed clonal profile. The sequences of the 16S rDNA allowed the grouping of 41 isolates in eight different phylogenetic groups, among these the bacteria of the genus: *Agrobacterium*, *Shigella*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ensifer*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Burkholderia*. Of these, six isolates producing IAA and P-solubilization ability which were evaluated for *in vitro* growth capacity were chosen. Isolated in this experiment, two contrasting were characterized: UFPRPALM 3-87 (*Burkholderia ambifaria*), more and UFPRPALM 1-14 (*Pantoea ananatis*), with lower ability to promote the growth of wheat seedlings *in vitro*, respectively. In the pot experiment, the isolates showed no responses of plant growth promotion in high fertility soils, but at low fertility condition, the genus *Pantoea* (UFPRPALM 1-14) showed the best performance in terms of increases in nitrogen concentration of shoots in wheat. There was a differential response of the isolates in terms of epiphytic and endophytic microbial population and between plant species and conditions of fertilization and/or inoculation.

Key-words: ARDRA, sequencing, *Zea mays*, *Triticum*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Complexo da enzima nitrogenase que catalisa a reação do N ₂ em NH ₃ . ..	25
Figura 2. Processos fisiológicos e químicos que influenciam a disponibilidade e transformação de fósforo na rizosfera.	27
Figura 3. Prováveis rotas biossintéticas de AIA em bactérias.	31
Figura 4. Localização das três áreas de coleta das plantas iscas.	44
Figura 5. Esquema de anelamento dos oligonucleotídeos na região Y1-Y3 do gene 16S rDNA.	50
Figura 6. Análises de PCR do gene 16S rDNA de isolados bacterianos escolhidos aleatoriamente. Linha M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Linhas 1 a 21 – isolados bacterianos; Linha A – <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.	74
Figura 7. Dendograma gerado a partir de ARDRA, obtido por digestão independente do produto amplificado do gene rDNA 16S com as enzimas <i>Hae</i> III, <i>Hinf</i> I e <i>Rsa</i> I, em gel de agarose ilustrando a relação (% dissimilaridade) entre os isolados de plantas trigo e milho, nas três áreas de coleta.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas	23
Tabela 2. Isolamento de bactérias diazotróficas do solo e de raízes e/ou parte aérea de diversas espécies de importância agrícola e econômica.....	39
Tabela 3. Características físico-químicas da camada de 0-20 cm do solo dos diferentes locais de coleta, Palotina/PR 2011	45
Tabela 4. Análises físico-química da camada de 0-20 cm dos solos usados nos experimentos de inoculação com bactérias na cultura do trigo, Palotina/PR e Toledo/PR – 2013.....	56
Tabela 5. Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos	57
Tabela 6. Caracterização parcial das 136 estirpes bacterianas isoladas de plantas de milho e trigo em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná, Iporã e Palotina/PR – 2011.....	59
Tabela 7. Número de bactérias isoladas de trigo e milho na área 1, 2 e 3 nos diferentes meios de cultura empregados, Palotina/PR – 2011.....	63
Tabela 8. Caracterização bioquímica através do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da concentração de ácido indol-3-acético (AIA) das estirpes bacterianas isoladas na área 1 (Argissolo vermelho) de raízes de trigo e milho na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2012.....	67
Tabela 9. Caracterização bioquímica através do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da concentração de ácido indol-3-acético (AIA) das estirpes bacterianas isoladas na área 2 (Latossolo roxo) de raízes de trigo e milho na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2012	69
Tabela 10. Caracterização bioquímica através do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da concentração de ácido indol-3-acético (AIA) das estirpes bacterianas isoladas na área 3 (Nitossolo vermelho) de raízes de trigo e milho na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2012.....	71
Tabela 11. Provável posição taxonômica de bactérias isoladas de raízes de trigo e milho em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2013	79
Tabela 12. Identificação preliminar com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA, das bactérias isoladas de raízes de trigo e milho em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2013	81

Tabela 13. Número de espécies identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rDNA dos isolados de plantas de trigo e milho nas três áreas, Palotina 2013	83
Tabela 14. Características morfofisiológicas avaliadas em plântulas de trigo <i>in vitro</i> , em função da inoculação com diferentes isolados de bactéria, e características bioquímicas dos isolados, Palotina/PR – 2012.....	85
Tabela 15. Características morfofisiológicas de plantas de trigo inoculadas com os isolados, Palotina/PR – 2013	89
Tabela 16. População microbiana endofítica em plantas de trigo e milho, Palotina/PR, 2012/2013.....	91
Tabela 17. Características morfofisiológicas de plantas de milho inoculadas com os isolados, Palotina/PR – 2012	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA – ácido abscísico

ACC – ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*

AIA – ácido indol-3-acético

AIP – ácido indol-3-pirúvico

API – *Appareils et Procédures d'Identification*

ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* ou Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado

ATP – adenosina trifosfato

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BPCV – bactéria promotora de crescimento vegetal

C – Carbono

CO₂ – dióxido de carbono

CTC – capacidade de troca catiônica

CTK – citocinina

CV – coeficiente de variação

DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

FASTA – *Fast All* ou alinhamentos rápidos para toda a informação biológica

FBN – fixação biológica de nitrogênio

Fe²⁺ - ferro

Fe³⁺ - férrico

Fe-proteína – Ferro proteína

GA₃, GA₄ – ácido giberélico

H⁺ - prótons

H₂S – gás sulfídrico

HPLC - *Cromatografia líquida de alto desempenho*

IAM – indol-3-acetamida

IAOx – indol-3-acetaldoxima

IGS – *Intergene Sequences*

IPyA – ácido indol-3-pirúvico

IS – índice de solubilização

ISF – índice de solubilização de fosfato

KNO₃ – nitrato de potássio

MALDI-TOF - ionização/dessorção da matriz assistida por laser – tempo de voo

MLSA – *Multilocus Sequence Analysis*

MLST – *Multilocus Sequence Typing* ou tipagem por sequenciamento de lócus múltiplos

MO – Matéria orgânica

Mo – Molibdênio

MoFe-proteína – Molibdênio Ferro proteína

N₂ – nitrogênio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NH₃ – amônia

NH₄NO₃ – nitrato de amônia

nif – nitrogen fixation

NO₃ – nitrato

NPK – nitrogênio, fósforo e potássio

O₂ – gás oxigênio

OH⁻ - hidróxido

P – fósforo

pb – pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou a reação em cadeia da polimerase

PCR-SSCP – *Single Strand Conformation Polymorphism*

PCV – promoção do crescimento vegetal

rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribossomal

RDP – *Ribosomal Database Project*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

S – enxofre

SmR1 - estirpe bacteriana de *Herbaspirillum seropedicae*

TGGE – *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*

Trp – triptofano

UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVO GERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 CULTURA DO TRIGO E DO MILHO E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	20
2.2 IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS DO SOLO.....	21
2.2.1 Promoção de Crescimento Vegetal.....	23
2.2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio	24
2.2.3 Solubilização de Fosfato	26
2.2.4 Produção de Sideróforos.....	29
2.2.5 Produção de Fitormônios	30
2.2.6 Outras Funções das Bactérias na Promoção do Crescimento	33
2.3 ASPECTOS ECONÔMICOS DA INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	34
2.4 ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE DAS RIZOBACTÉRIAS.....	37
2.5 PRINCIPAIS MÉTODOS EMPREGADOS NO ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	44
3.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS ISOLADOS	46
3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	47
3.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	48
3.4.1 Extração de DNA Genômico	48
3.4.2 Amplificação do Gene 16S rDNA	49
3.4.2.1 Oligonucleotídeos Iniciadores Utilizados	50
3.4.3 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado	50
3.4.4 Sequenciamento do Gene 16S rDNA.....	51
3.4.4.1 Análise das Sequências do Gene 16S rDNA.....	52
3.5 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE TRIGO	53
3.5.1 Contagem de Células Bacterianas Epifíticas e Endofíticas.....	55
3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NA CULTURA DO TRIGO: ENSAIO DE INOCULAÇÃO EM VASO	56

3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NA CULTURA DO MILHO: ENSAIO DE INOCULAÇÃO EM VASO	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS	59
4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	65
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	73
4.3.1 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado	73
4.3.2 Análise das Sequências do Gene 16S rDNA	77
4.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE TRIGO	84
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NAS CULTURAS DO TRIGO E DO MILHO: ENSAIO DE INOCULAÇÃO EM VASO	88
5 CONCLUSÕES	100
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS	126

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam a maior riqueza em diversidade bioquímica e molecular na natureza. Dentre estes, encontram-se as bactérias diazotróficas, que em associação com as plantas, podem trazer benefícios como a promoção do crescimento vegetal. Essa associação tem sido demonstrada pela melhoria no desempenho das plantas, sendo de extrema importância para a agricultura (AZEVEDO, 1998; GALVÃO et al., 2010).

As bactérias diazotróficas são potenciais como promotoras de crescimento vegetal, produzindo fitormônios, fixando nitrogênio (N_2) ou devido a outros mecanismos que contribuam para o desenvolvimento da planta, como produção de sideróforos, solubilização de fosfatos e regulação dos níveis endógenos de etileno, um fitormônio sinalizador de estresses em vegetais. No entanto, a interação entre bactérias diazotróficas e gramíneas não ocorre da mesma maneira que a interação entre rizóbio e leguminosas, onde se formam os nódulos característicos da interação (FIGUEIREDO et al., 2010).

As inconscistências nos resultados da utilização de bactérias diazotróficas endofíticas em gramíneas, pela especificidade de interação entre a bactéria, a espécie vegetal, e as condições nutricionais, assim como de fatores abióticos do meio ambiente fazem com que os estudos de performance sejam cruciais para a recomendação e uso em escala comercial dos mesmos (SALA; SILVEIRA e CARDOSO, 2007, MOREIRA et al., 2010; BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Desta forma, experimentos que visem o isolamento e caracterização de bactérias em regiões nativas podem proporcionar a identificação de novas estirpes de bactérias diazotróficas que apresentam características importantes na fixação biológica de nitrogênio e na promoção de crescimento vegetal. A caracterização fenotípica e genotípica é essencial para a compreensão da diversidade de espécies bacterianas em cada local (REIS et al., 2010).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados buscando o isolamento, caracterização e identificação de bactérias diazotróficas em gramíneas (KHALID; ARSHAD e ZAHIR, 2004; SALA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; ROESCH et al., 2007, PEDRINHO, 2009; ILYAS e BANO, 2010; MAGNANI, 2010; RASHID; CHARLES e GLICK, 2012; ARRUDA et al., 2013).

Outros buscam elucidar a interação planta-bactéria (BERG, 2009; WEYENS et al., 2009; BENEDUZI et al., 2013), além da demonstração de potenciais aplicações na agricultura e meio ambiente como: controle de doenças e pragas (COMPANT et al., 2005; MENDES et al., 2007); promoção do crescimento vegetal (CERIGIOLI, 2005; ROJAS-TAPIAS et al., 2012; SALAMONE et al., 2012); fixação biológica de nitrogênio em plantas (KUSS, 2006; MARRA et al., 2012); produção de metabólitos de interesse farmacológico e biotecnológico (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006); vetores para introdução de genes de interesse em plantas (MURRAY; LATCH; SCOTT, 1992) e produção de produtos biológicos que reduzam a utilização de fertilizantes na natureza (SALA et al., 2008; SINGH; PANDEY e SINGH, 2011; PINTO JUNIOR, 2013) entre outros.

A região oeste do Paraná se caracteriza pela pujante agricultura, com alto grau de tecnificação das suas propriedades. Por outro lado, os agricultores sempre demandam por tecnologias que visem à diminuição dos custos e por alternativas ecosustentáveis. Desta forma, estudos envolvendo o isolamento, caracterização e identificação de bactérias diazotróficas associativas com gramíneas nesta região são necessários e promissores.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a diversidade de bactérias endofíticas obtidas de solos do oeste do Paraná, usando plantas de milho e trigo como iscas e avaliar o potencial dos isolados para a promoção do crescimento vegetal (PCV).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias endofíticas de raízes de milho e trigo em três áreas de mata.
- Caracterizar bioquimicamente os isolados endofíticos, por análises do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da produção de ácido indol-3-acético (AIA).
- Determinar as identidades das sequências e o posicionamento taxonômico dos isolados endofíticos com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA (ácido desoxirribonucleico ribossomal).

- Avaliar o potencial de isolados bacterianos na promoção do crescimento de plântulas de trigo *in vitro*, bem como de plantas de milho e trigo em solo com baixa fertilidade e de trigo em solo de alta fertilidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO TRIGO E DO MILHO E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O trigo, *Triticum* spp. é originário do centro de origem Asiático Central, pertence à família Poaceae e é o segundo cereal mais produzido no mundo, com significativa importância na economia agrícola global. Este cereal de inverno chegou ao Brasil por volta do século XVI, e foi primeiramente introduzido no estado de São Paulo, de onde migrou para o sul, sendo que seu estabelecimento ocorreu por volta de 1960. Esta cultura é estratégica para o país, pois a produção nacional aumentou, girando em torno de 5 milhões de toneladas de trigo, porém o consumo interno é de 10 milhões de toneladas, deixando o país a mercê da importação (EMBRAPA, 2013).

Segundo o Brasil (2013), está previsto uma taxa de aumento de consumo do trigo de 1,31% ao ano, contudo, acredita-se na possibilidade da redução da importação, já que o país está investindo na autossuficiência da produção interna. Por sua produção alavancar parte da economia brasileira, é de extrema importância futuros investimentos no seu cultivo, que levam a maximizar a produção impulsionando a cultura ser uma das principais e mais rentáveis do país (CUNHA, 2009).

A cultura do trigo possui vários fatores limitantes para o seu desenvolvimento, dentre estes, se encontra a grande exigência desta cultura por fertilizantes, por influenciar diretamente na produtividade dos grãos, além de contribuir para o aumento do custo total de produção da cultura (FERREIRA et al., 2010; GIROTTO, 2012).

O milho é uma gramínea originária do centro Mexicano do Sul, e centro secundário Sul Americano, pertence à família Poaceae e espécie *Zea mays* L. (MAGALHÃES, 2002). É uma das culturas mais importantes do mundo, e possui relevante importância econômica devido a sua diversificada forma de utilização, podendo ser empregado tanto na composição de ração animal quanto para a indústria de alta tecnologia. Na alimentação humana o cereal não é muito apreciado em grão, no entanto os seus derivados, representam um subsídio importante em regiões de baixa renda (DUARTE, 2000).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, e no país esta cultura é uma das mais tradicionais, por ser cultivada em diferentes condições de clima e solo. Sua produção na primeira safra 2012/13, foi de 15.567,6 mil toneladas, tendo uma variação de 21% se comparado com a safra 2011/12 que foi de 12.868,6 mil toneladas, na região sul do país, isso, levando-se em consideração que a área destinada ao seu cultivo nesta região teve uma diminuição de 9,5% se comparado com a safra 11/12. Evidenciando um aumento expressivo na produtividade (CONAB, 2013).

Semelhante ao trigo, o aumento da produtividade tem por início a utilização de práticas de manejo adequadas à cultura, em especial, o adequado suprimento nutricional. Através de pesquisas foram constatadas que as maiores exigências da cultura referem-se ao nitrogênio e potássio, seguidos por cálcio, magnésio e fósforo (COELHO et al., 2000).

Neste contexto, a exploração da fixação biológica de nitrogênio (FBN), e promoção de crescimento vegetal realizada por bactérias diazotróficas tem se mostrado de grande importância e potencial para as culturas do milho e do trigo reduzindo assim a utilização de fertilizantes nitrogenados, consequentemente os impactos ambientais e os custos de produção, sem que ocorram prejuízos ao produtor (REIS, 2007; MORAIS, 2012; PINTO JUNIOR, 2013).

2.2 Importância dos Microrganismos do Solo

A microbiota do solo é constituída por um número expressivo de microrganismos, que possuem um papel fundamental nos processos de mineralização da matéria orgânica, fornecendo à planta nutrientes que são importantes ao seu desenvolvimento. Como o solo é formado por parte orgânica e inorgânica (rochas e minerais), os microrganismos do solo são responsáveis pelas inúmeras reações bioquímicas que permitem a decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos (SANON et al., 2009).

Uma melhor compreensão da dinâmica espacial e temporal nas interações entre plantas e bactérias da rizosfera, bem como a natureza e a regulamentação dos mecanismos envolvidos podem contribuir para o desenvolvimento de cultivares eficientes na aquisição de nutrientes (MARSCHNER, CROWLEY e RENGEL, 2011).

Desta forma, a aquisição dos nutrientes do solo pelas plantas é regulada pelo crescimento de suas raízes e da interação com os componentes bióticos e o abiótico do solo. Essa interação se manifesta em grande parte pelas propriedades físicas, químicas e biológicas da rizosfera (HINSINGER et al., 2009).

As plantas e microrganismos desenvolveram mecanismos semelhantes para mobilização e absorção de nutrientes, com intensa competição por absorção, sendo que os microrganismos são capazes de assimilar os exsudatos das plantas, como também podem decompor estes compostos e imobilizar nutrientes contidos na biomassa, antes que atinjam a superfície da raiz (MARSCHNER; CROWLEY e RENGEL, 2011).

Montesinos (2003) estimou baseado em métodos moleculares que existem mais de 4000 espécies de microrganismos por grama de solo. Desta forma, podem estar presentes na rizosfera diferentes grupos de organismos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas, protozoários e nematoides (HINSINGER et al., 2009). Dentro dessas espécies, as bactérias, podem ser encontradas em número de 10^{14} por m^2 de solo, correspondendo a aproximadamente 50 g de biomassa (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Sendo assim, sua atividade e proliferação é intensa na rizosfera, pelo fato de ser o local de liberação de compostos orgânicos pelas raízes por deposição, exsudação e secreção. As bactérias próximas às raízes das plantas podem ser benéficas, deletérias (patogênicas) ou neutras (CARDOSO; TSAI e NEVES, 1992; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN e OKON, 2003).

No grupo das bactérias benéficas encontram-se as bactérias diazotróficas, consideradas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que podem ser agrupadas como bactérias rizosféricas (*Beijerinckia fluminensis* e *Azotobacter paspali*), endofíticas facultativas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*) e endofíticas obrigatórias (*Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia brasilensis* e *B. tropica*) (BALDANI e BALDANI, 2005).

2.2.1 Promoção de Crescimento Vegetal

As bactérias quando colonizam o sistema radicular tem apresentado a capacidade de promover o crescimento vegetal pela alteração da arquitetura radicular por mecanismos diretos como a fixação biológica de nitrogênio e/ou produção de fitormônios; e por mecanismos indiretos como, por exemplo, o antagonismo a fitopatógenos (FRANCHE; LINDSTRÖM e ELMERICH, 2009; BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

Trabalhos tem demonstrado que as bactérias diazotróficas podem promover o crescimento da planta (KHALID; ARSHAD e ZAHIR, 2004; GALVÃO et al., 2010; ROJAS-TAPIAS et al., 2012; SALAMONE et al., 2012), conforme segue na tabela 1:

Tabela 1. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas

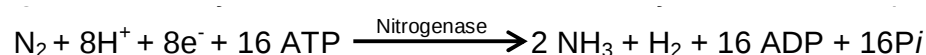
Mecanismo	Referência
Fixação Biológica do Nitrogênio	Kennedy et al., 1997 Bhattacharjee, Singh e Mukhopadhyay, 2008 Marra et al., 2012
Produção de Sideróforos	Éssen et al., 2007 Beneduzi et al., 2008a D'Onofrio et al., 2010
Produção de Fitormônios	Feng, Sheng e Song, 2006 Kuss et al., 2007 Mendes et al., 2007 Egamberdieva et al., 2008 Ali et al., 2009 Krome et al., 2010
Atividade da ACC-deaminase	Glick, 2005 Shaharoona, Arshad e Zahir, 2006 Glick et al., 2007 Saleem et al., 2007
Solubilização de Fosfato	Das, Lyla e Khan, 2007 Song et al., 2008 Taurian et al., 2010 Beneduzi et al., 2013
Controle de doenças de plantas	Adhikari et al., 2001 Costa et al., 2002 Nunes et al., 2002 Hsieh, Huang e Erikson, 2005 Mendes et al., 2007

Devido às especificidades de interações com as plantas hospedeiras e a facilidade de isolamento em meio de cultura, as bactérias diazotróficas tem sido amplamente estudadas pelo seu potencial biotecnológico de aplicação em culturas de importância econômica, principalmente em gramíneas (VIDEIRA et al., 2004; SALA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; ROESCH et al., 2007; BENEDUZI et al., 2008a; BENEDUZI et al., 2008b; RODRIGUES et al., 2008; PEDRINHO, 2009; ILYAS e BANO, 2010; MAGNANI, 2010; ARZANESH et al., 2011; LASLO et al., 2012; VIANA, 2012; ARRUDA et al., 2013; BENEDUZI et al., 2013; JI, GURURANI e CHUN, 2013). A rizosfera microbiana seria vigorosamente associada com a ciclagem biogeoquímica de nutrientes como C (carbono), P (fósforo), N (nitrogênio) e S (enxofre), remoção de toxinas e produção de fitormônios (BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

2.2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos elementos minerais requerido em maiores quantidades pelas plantas, e é também o que mais limita o crescimento por estar diretamente relacionado com a produção de novas células e tecidos (SOUZA e FERNANDES, 2006).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) permite fixar o nitrogênio (N₂) atmosférico em amônia. Esta FBN é possível apenas a um seletivo grupo de microrganismos, as bactérias diazotróficas, de vida livre (anaeróbias, aeróbias e facultativas) ou endofíticas. Estas bactérias possuem a enzima nitrogenase, cuja presença as torna capazes de reduzir o N₂ para a forma combinada inorgânica de amônia (NH₃), que pode ser assimilado pelas plantas e outros organismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A reação geral da redução do N₂ a amônia sob condições normais é:



Essa reação é catalisada pelo complexo da enzima nitrogenase que atua na hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) e na transferência de elétrons para o processo de redução do N₂ atmosférico à NH₃, na ausência de oxigênio (BURRIS, 1991).

O complexo enzimático pode ser separado em duas unidades proteicas distintas: a Fe-proteína e a MoFe-proteína. A ferredoxina atua como doador de elétrons para a Fe-proteína, que hidrolisa ATP e reduz a MoFe-proteína, a qual pode reduzir o N_2 e H^+ (Figura 1). Uma forma de estimar a atividade da nitrogenase é através da reação do acetileno a etileno (FRANCHE; LINDSTRÖM e ELMERICH, 2009):

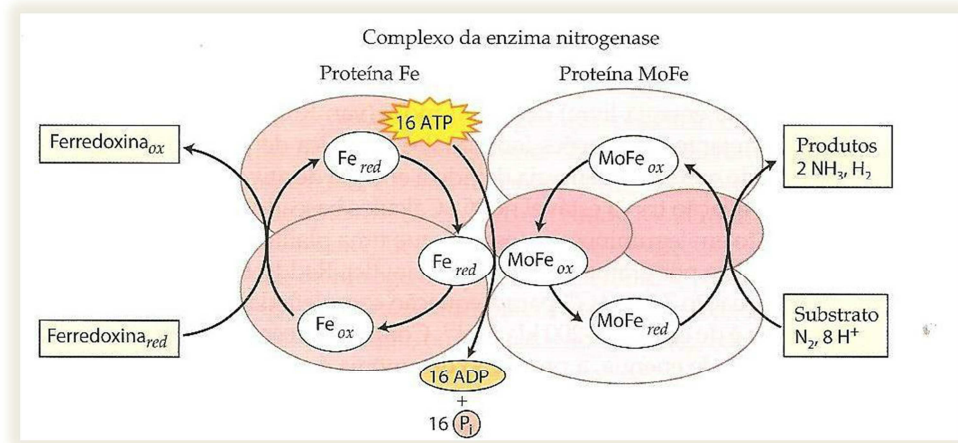


Figura 1. Complexo da enzima nitrogenase que catalisa a reação do N_2 em NH_3 .
FONTE: TAIZ e ZEIGER, 2013.

Pela complexidade da fixação biológica de nitrogênio, é requerida a expressão de um conjunto de genes denominados *nif* (*nitrogen fixation*), que codificam as proteínas envolvidas diretamente no processo de redução do N_2 , e sua regulação, onde Fe-proteína é codificada pelo gene *nifH* e MoFe-proteína pelos genes *nifD* e *nifK* (PEDROSA e YATES, 1984; FRANCHE; LINDSTRÖM e ELMERICH, 2009). Diferentes trabalhos reportam a atividade da nitrogenase em bactérias diazotróficas, até mesmo por vias independentes de molibdênio, substituído por diferentes elementos como vanádio e o ferro (FALLIK; CHAN e ROBSON, 1991; HUREK; EGENER e REINHOLD-HUREK, 1997; LOVELESS; SAAH e BISHOP, 1999; JAMES, 2000; BETANCOURT et al., 2008; SILVA et al., 2011) e a presença de diferentes genes *nif* envolvidos na regulação da fixação biológica de nitrogênio (PEDROSA et al., 1989; DRUMMOND, WALMSLEY e KENNEDY, 1996; ELMERICH et al., 1997; SEVILLA et al., 1997; GRABBE; KLOPPROGGE e SCHIMITZ, 2001; POTRICH; PASSAGLIA e SCHRANK, 2001; RONCATO-MACCARI et al., 2003; PEDROSA et al., 2011).

A utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio tem despertado interesse no meio agrícola, devido principalmente ao seu impacto econômico. Uma vez que são capazes de fixar biologicamente cerca de 85% do nitrogênio necessário às plantas (SOUZA, 2001). O maior destaque ainda esta na simbiose existente entre a família das leguminosas com o gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. No entanto, avanços nessa área tem demonstrado a capacidade de outras espécies de bactérias diazotróficas em fixar nitrogênio em gramíneas como espécies de *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BALDANI e BALDANI, 2005).

2.2.3 Solubilização de Fosfato

O fósforo (P) é um macronutrientes essencial para planta, por participar de processos metabólicos importantes como transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos e glicose, respiração, ativação e desativação de enzimas, entre outros. No entanto, dos três macronutrientes (NPK), o P é o elemento exigido em menores quantidades, porém o mais usado nas adubações (RAIJ, 1991; FERNANDES, 2006).

Muitos tipos de solos são deficientes em P, tendo sua concentração menor que 10 μM em pH 6.5, no qual o P esta mais solúvel (GYANESHWAR et al., 2002). Os solos agricultáveis contém grande reserva de P, devido à aplicações regulares. Contudo, uma larga proporção de P inorgânico e rapidamente adsorvida após aplicação de fertilizantes fosfatados, tornando-se indisponíveis para as plantas. O processo de adsorção e a precipitação de P que ocorre nos solos são dependentes de pH e do tipo de solo. Em solo ácidos, óxidos fracos e hidróxidos de alumínio e de ferro tem a capacidade de reter o P, já em solos alcalinos, a fixação ocorre devido a presença de cálcio, causando baixa eficiência na solubilização de fertilizantes fosfatados (GYANESHWAR et al., 2001).

Dentre os microrganismos do solo, as bactérias rizosféricas tem grande potencial de solubilizar as formas insolúveis de fosfatos, aumentando e disponibilizando P diretamente para as plantas pela solubilização e mineralização deste elemento, e em solos alcalinos, pela diminuição do pH (MARSCHNER, CROWLEY e RENGEL, 2011). Desta forma, disponibilizando o nutriente para as

plantas, que será assimilado por estas para produzir biomassa (Figura 2) (GRAHAM e VANCE, 2000).

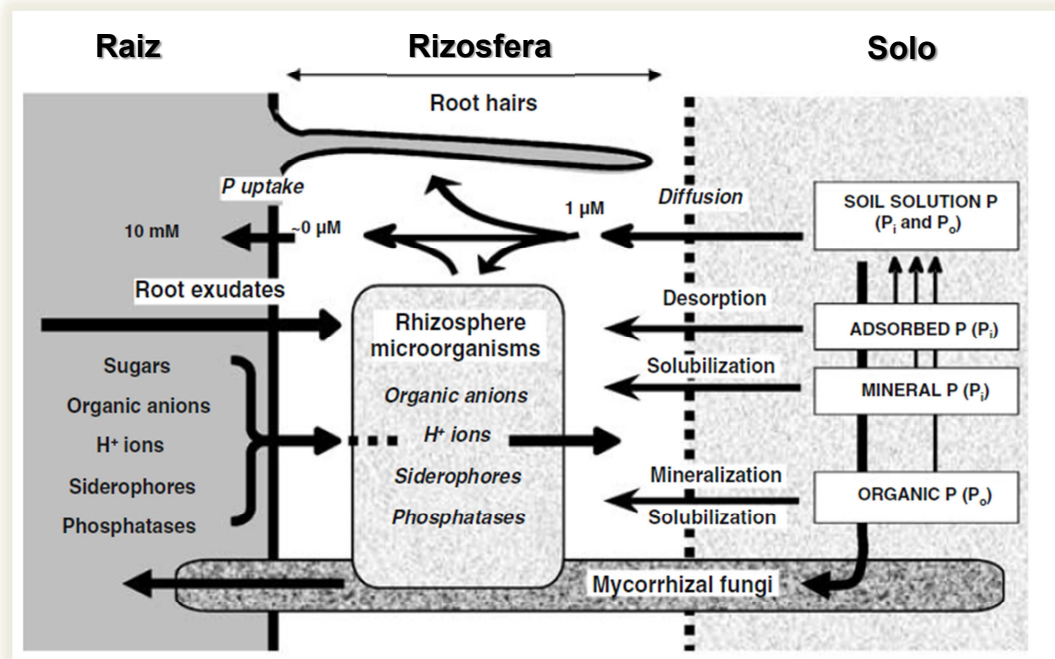


Figura 2. Processos fisiológicos e químicos que influenciam a disponibilidade e transformação de fósforo na rizosfera.
FONTE: RICHARDSON et al., 2009.

Há dois tipos de P presentes no solo: os fosfatos inorgânicos e orgânicos. A grande maioria dos fosfatos estão em formas insolúveis e não disponíveis para as plantas. Formas orgânicas de P disponíveis, principalmente por adubos orgânicos, podem fornecer quase todo o P necessário para as plantas e podem corresponder a quase 80% do P total assimilado. Plantas e microrganismos podem aumentar a solubilidade da forma insolúvel de P inorgânico libertando prótons, OH⁻ ou CO₂, e de ácidos orgânicos tais como o citrato, malato e oxalato, e podem mineralizar P orgânico por libertação de várias enzimas (MARSCHNER, CROWLEY e RENGEL, 2011). Esta mineralização é mediada principalmente por enzimas fosfatases de origem microbiana ou vegetal, que catalisam a hidrólise de ambos ésteres e anidridos do ácido fosfórico, sendo dependentes do pH do solo para serem ativas (KREY et al., 2013).

Chen et al. (2006) observaram que há uma correlação inversa entre o pH dos solos e a solubilização de fosfato. A produção de ácidos orgânicos pelas estirpes bacterianas acidificaria o meio, facilitando e promovendo a solubilização do mesmo (BENEDUZI et al., 2008a).

Outras formas de solubilização de P podem ocorrer pela presença de fitases (mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolases) que são fosfatases de alto peso molecular produzidas por microrganismos como *Aspergillus* e *Bacillus* (RODRÍGUEZ et al., 2006). Recentemente, tem sido sugerido que o aumento da absorção de Ca pode também aumentar a disponibilidade de P, devido à solubilização de fosfatos de Ca na rizosfera (DEVAU et al., 2010).

Alguns gêneros de bactérias tem merecido destaque na solubilização de fosfato como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* (DAS, LYLA e KHAN, 2007), *Rhizobium* (MARRA et al., 2011), *Burkholderia* (SONG et al., 2008; MARRA et al., 2012).

Outros autores como Marra et al. (2012), observaram que as bactérias *Bacillus subtilis*, *Microbacterium imperiale* e *Paenibacillus kribbensis* são solubilizadoras de fosfato, enquanto Dawwam et al. (2013) verificaram solubilização por estirpes de *Achromobacter xylosooxidans* e *Bacillus cereus*. A espécie *Pantoea agglomerans* foi relatada por Furnkranz, Muller e Berg (2009), como solubilizadora de fosfato, e as espécies bacterianas *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia* sp. por Beneduzi et al. (2013). Arruda et al. (2013) observaram que estirpes *Chryseobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp. foram positivas para solubilização de fosfato.

Diferentes meios têm sido empregados para verificar a capacidade de solubilização de fosfato em bactérias. Nautiyal et al. (2000), em seu trabalho com o meio NBRIP, verificou que as bactérias sob diferentes concentrações de sais de cálcio, aumentaram sua capacidade de solubilização do fosfato na presença desses sais. No entanto, a caracterização bioquímica de estirpes quanto à capacidade de solubilizar fosfato divergem na literatura, onde trabalhos apontam que determinadas estirpes bacterianas solubilizam fosfato e em outros trabalhos as mesmas estirpes, sob condições diferentes, não apresentam esta capacidade (RICHARDSON et al., 2009).

Diante do exposto, novas alternativas para a identificação e caracterização de estirpes solubilizadoras estão sendo propostas em nível molecular. Chen et al. (2006), identificou estirpes bacterianas solubilizadoras de fosfato baseado em sequencias do gene 16S rDNA e sua filogenia, verificando isolados de *Rhodococcus erythropolis*, *Serratia marcescens*, *Bacillus megaterium* e *Arthrobacter ureafaciens*, *Arthrobacter* sp., *Gordonia* sp., *Chryseobacterium* sp., *Phyllobacterium*

myrsinacearum e *Delftia* sp. Já Chung et al. (2005), usando a mesma técnica agruparam os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea*. Pérez et al. (2007) correlacionaram a presença dos genes *gdh* e *pqqE*, envolvidos na produção de ácido glucônico, com a capacidade de solubilização de fosfatos por isolados bacterianos obtidos de rocha limonítica.

Uma aplicação biotecnológica dessas estirpes solubilizadoras de fosfato foi sugerida por Schoebitz, Ceballos e Ciampi (2013), que encapsulou duas bactérias solubilizadoras de fosfato, *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia* sp., em alginato de sódio e em grânulos de amido de batata, como forma de investigar a variação do pH, a atividade enzimática da fosfatase alcalina e a solubilização de fosfato na absorção de P por plantas de trigo, desta forma para os autores a inoculação de rizobactérias imobilizada é uma opção promissora para veículos de inoculantes para aumentar o nível de P em plantas de trigo e poderia ser uma técnica inovadora para aplicação na indústria agrícola.

2.2.4 Produção de Sideróforos

O ferro é um elemento que no solo é relativamente insolúvel na forma de Fe^{3+} , dificultando a assimilação desse nutriente essencial pelas plantas, que absorvem formas reduzidas de ferro (Fe^{2+}). Alguns microrganismos do solo podem sequestrar ferro de baixo peso molecular e disponibilizar para as plantas em forma de complexo sideróforo- Fe^{3+} (JURKEVITCH; HADAR e CHEN, 1992). Os sideróforos são peptídeos secretados por microrganismos diante de um estresse de Fe^{3+} , desta forma as bactérias que produzem sideróforos atuam como promotores de crescimento vegetal, por disponibilizar o ferro da rizosfera para a planta e/ou imobilizar o ferro que estaria disponível para a proliferação de fitopatógenos, inibindo assim sua colonização (WANG et al., 1993; VESSEY, 2003).

Pedrosa et al. (2011), em seu trabalho com *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, verificou em seu genoma um gene com cerca de 27.483 pb, que codifica um peptídeo modular sintase que, provavelmente é a única proteína na síntese de sideróforos. Ainda neste estudo, foi observado que 27 genes estão envolvidos com o transporte e metabolismo de ferro, onde existem inúmeros receptores de sideróforos, reforçando a capacidade dessa bactéria em promover crescimento na planta em solos com limitação de ferro.

Sharma e Johri (2003) demonstraram a promoção de crescimento em plantas de milho em solo com condições limitantes de ferro, pela utilização de estímulos bacterianos de *Pseudomonas*. Lacava et al. (2008) verificaram que todas as cepas de *Methylobacterium* spp. possuem a capacidade de produção de sideróforos, no entanto, nem todas produziram o tipo de sideróforo catecol, mas foram capazes de produzir o tipo hidroxamato. Neilands e Nakamura (1991) relatam que algumas bactérias produzem o sideróforo hidroxamato, enquanto que outras bactérias conseguem produzir o tipo catecolato. Penyalver et al. (2001), constataram que *Agrobacterium rhizogenes* são capazes de produzir grandes quantidades de sideróforo hidroxamato.

A maioria dos estudos sobre a produção de sideróforos bacterianos tem sido realizado com microrganismos que crescem sob condições aeróbicas. Éssen et al. (2007) comprovaram que a produção de sideróforos por *Pseudomonas stutzeri* ocorre tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas.

2.2.5 Produção de Fitormônios

Os fitormônios são substâncias orgânicas, que desempenham importante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Os principais fitormônios são as auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e ácido abscísico (CID, 2000). A capacidade das bactérias promoverem crescimento vegetal através da produção de fitormônios tem sido evidenciada em muitos trabalhos (PEDRAZA et al, 2004; CERIGIOLI, 2005; MARCHIORO, 2005; KUSS, 2006; MENDES et al., 2007; EGAMBERDIEVA et al., 2008; PEDRINHO et al., 2010).

Dentre os hormônios vegetais o que merece maior destaque é o AIA (ácido indol-3-acético), hormônio do grupo das auxinas que promove o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (CID, 2000). Há evidências de várias rotas de biossíntese de AIA (Figura 3), mas a principal é a via dependente do aminoácido triptofano, usado como precursor fisiológico para a síntese de auxinas em plantas e bactérias (KHALID; ARSHAD e ZAHIR, 2004). A biossíntese do AIA Trp-dependente possui diversas rotas, que são nomeadas de acordo com o seu intermediário: a via ácido indol-3-pirúvico (AIP), a via indol-3-acetamida (IAM), a via triptamina, e a via indol-3-

acetaldoxima (IAOx). A produção de compostos indólicos *in vitro*, como ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-pirúvico (IPyA) e indol-3-acetamida (IAM), foi evidenciada na bactéria *Paenibacillus polymyxa* (BENEDUZI et al., 2008a).

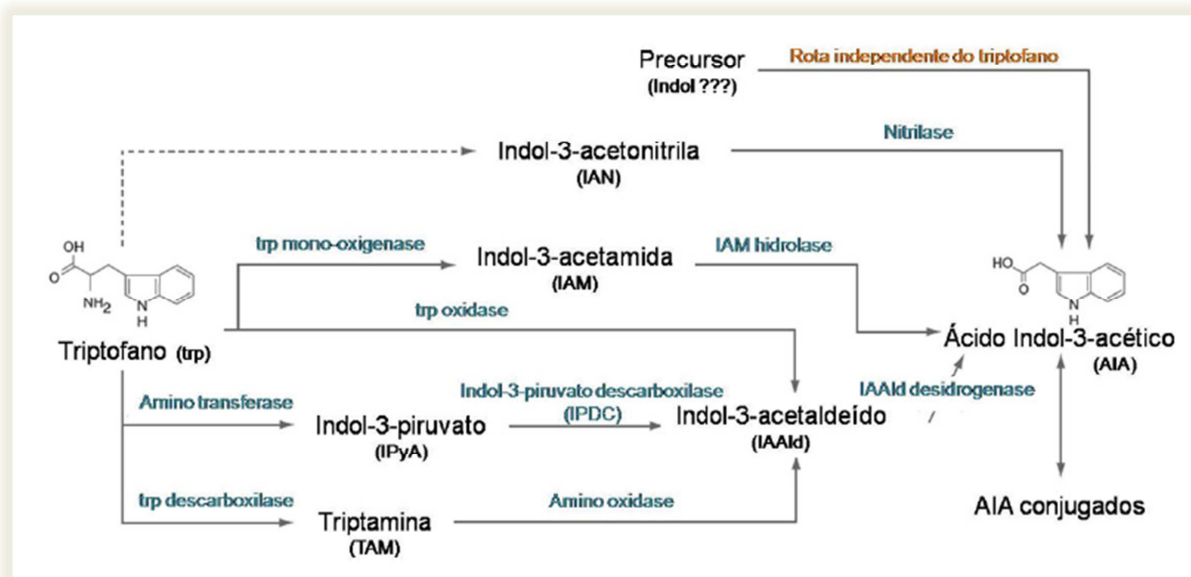


Figura 3. Prováveis rotas biossintéticas de AIA em bactérias.

FONTE: GALVÃO et al., 2010.

Na microbiota do solo, os exsudados radiculares são fontes naturais de triptofano, contribuindo com o aumento da biossíntese de auxina na rizosfera, desta forma a habilidade de sintetizar fitormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas a plantas. A produção de AIA pelas bactérias faz parte da sua atuação quando associadas com as plantas, promovendo tanto a elongação como a divisão e diferenciação celular nos tecidos vegetais (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN e OKON, 2003).

Vários autores têm mostrado que a produção de AIA e a fixação biológica do nitrogênio por bactérias diazotróficas contribuem significativamente com a promoção do crescimento em gramíneas (MEHNAZ e LAZAROVITS, 2006; EGAMBERDIEVA, 2007; EGAMBERDIEVA et al., 2008; BENEDUZI et al., 2013).

Diversos gêneros bacterianos, isolados do solo ou de plantas iscas, têm revelado grande variabilidade de microrganismos capazes de produzir grandes quantidades de auxinas e compostos indólico *in vitro*, como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Rhizobium* e

Paenibacillus (PEDRAZA et al., 2004; PICARD e BOSCO, 2005; BENEDUZI et al., 2008a; EGAMBERDIEVA et al., 2008; EGAMBERDIEVA, 2009; ALI et al., 2009; SPAEPEN et al., 2009; MONTAÑEZ et al., 2012; BENEDUZI et al., 2013; DAWWAM et al., 2013; JI, GURURANI e CHUN, 2013).

Outro fitormônio importante na interação planta-bactéria é o etileno, cuja resposta das plantas a diferentes formas de estresse envolve a produção endógena deste fitormônio. O efeito fisiológico quando as células vegetais percebem as moléculas de etileno é a senescência das células próximas ao sítio de biossíntese, como consequência leva à abscisão de frutos ou folhas, ao desenvolvimento de doenças, a inibição do crescimento, a síntese de enzimas (quitinase) e antibióticos (CID, 2000; PIERIK et al., 2006).

Muitas bactérias promotoras de crescimento produzem a enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico desaminase (ACC desaminase), essa enzima catalisa a formação do α -cetobutirato, que cliva o ACC, precursor do etileno. Essa enzima na associação planta-bactéria leva a uma diminuição da concentração de ACC disponível para a conversão em etileno (GLICK, 2005).

Devido ao fato de que menos etileno será sintetizado pela planta, menores serão os efeitos inibitórios deste fitormônio na elongação das raízes, contribuindo para o crescimento radicular (SINGH; PANDEY e SINGH, 2011). Em paralelo, as bactérias se beneficiam por usar os produtos da reação da hidrólise do ACC como nutriente para seu próprio crescimento, aumentando a sobrevivência bacteriana na rizosfera, e promovendo de forma indireta o crescimento da planta (SHAHAROONA et al., 2006; GLICK et al., 2007; FURNKRANZ, MULLER e BERG, 2009). Desta forma, a presença da ACC deaminase nas bactérias e de auxinas estão positivamente correlacionadas com o crescimento da planta hospedeira (SALEEM et al., 2007).

Além da auxina e do etileno, trabalhos tem comprovado que as bactérias promotoras de crescimento vegetal podem contribuir com a síntese de outros fitormônios como citocininas, giberelinas e ácido abscísico. Egamberdieva et al. (2008) ao cultivar *Pantoea agglomerans* em meio LB líquido, detectaram a produção de quatro fitormônios por esta bactéria: AIA (ácido indol-3-acético), ABA (ácido abscísico), GA₄ (ácido giberélico) e CTK (citocinina). Karadeniz, Topcuoglu e Inan (2006), quantificaram por HPLC os níveis de AIA (ácido indol-3-acético), ABA (ácido abscísico), GA₃ (ácido giberélico) e zeatina (citocinina) em diferentes estirpes

bacterianas. Em *Azospirillum* sp. foi verificado a produção de giberelinas, representando um importante papel nos primeiros estágios de crescimento em gramíneas, por reduzir os efeitos de déficit de água em sementes de cereais sob estresse osmótico ou salino (CREUS et al., 1998). Ilyas e Bano (2010) ao isolarem *Azospirillum* spp. de plantas de trigo em diferentes condições de umidade, verificaram que os isolados da área de estresse hídrico tiveram os maiores índices de AIA, GA, Zeatina (CTK) e ABA.

Outros gêneros de bactérias tem se mostrado capazes de produzir fitormônios, como *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (ZAKHAROVA et al., 1999; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; LEE et al., 2004). No entanto, a produção de fitormônios é um mecanismo de interação planta-bactéria, sendo o efeito desta associação variável de acordo com o genótipo do hospedeiro e do próprio microrganismo (DROGUE et al., 2012).

2.2.6 Outras Funções das Bactérias na Promoção do Crescimento

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) têm sido amplamente estudadas visando reduzir o impacto ambiental causado pelo uso de fertilizantes químicos, bem como aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção. A contribuição destes microrganismos vai além de disponibilizar nutrientes e auxiliar na assimilação destes pelas plantas. De maneira geral, estão envolvidos em mais de um mecanismo para promover o crescimento da planta, tais como produção de enzimas, bioativos, antibióticos e metabolitos. Sendo assim, a sua presença promove efeitos benéficos sobre a sanidade e o crescimento das plantas, suprimindo a ação de fitopatógenos, por serem agentes potenciais para o controle biológico (BABALOLA, 2010; HAYAT et al., 2010).

Mendes et al. (2007), em seu trabalho com *Burkholderia cepacia*, verificaram que a mesma tem potencial para controlar *Fusarium* em cana-de-açúcar. Vários autores têm relatado que *Pantoea agglomerans* é eficaz como controle biológico de algumas doenças em plantas (NUNES et al., 2001; COSTA et al., 2002; NUNES et al., 2002; HSIEH, HUANG e ERIKSON, 2005). Outros trabalhos demonstram o potencial antagônico que as bactérias endofíticas possuem frente a alguns patógenos (ARAVIND et al., 2010; LI et al., 2012; LUDUEÑA et al., 2012; YANG et al., 2013; SOBOLEV; ORNER e ARIAS, 2013), sendo que os mecanismos

envolvidos neste processo podem ser variados. Trabalhos confirmam que as bactérias promotoras de crescimento estão envolvidas na indução de resistência sistêmica na planta (PRESS et al., 2001; KLOEPPER e RYU, 2006; KAVINO et al., 2007; PAVLO et al., 2011; BARRETT et al., 2012).

Desta forma, as bactérias que possuem a característica de biocontrole devem ser capazes de proteger a planta hospedeira contra a colonização de patógenos. Para isso um grande número de compostos que são tóxicos para os organismos patogênicos são sintetizados pelas bactérias, tais como cianeto de hidrogênio, fenazinas, pirrolnitrina e pioluteorina, bem como outras enzimas e antibióticos (BABALOLA et al., 2010). Um exemplo de antibiótico é o diacetyl-phloroglucinol, produzido por algumas estirpes bacterianas como *Pseudomonas fluorescens*, que suprime uma ampla gama de patógenos (DUFFY, KEEL e DEFAGO, 2004).

As pesquisas envolvendo bactérias promotoras de crescimento apontam para a necessidade de explorar comercialmente estas bactérias como biofertilizantes e/ou bioinoculantes, devido a seus benefícios: são mais seguros, mostram reduzidos danos ambientais e um risco potencialmente menor para a saúde humana, são eficazes em pequenas quantidades, ao se multiplicarem são controlados pela planta, se decompõem mais rapidamente do que os pesticidas químicos convencionais, o desenvolvimento de resistência é reduzido devido a vários mecanismos, e, podem ser também utilizadas no manejo convencional de pragas ou em sistemas integrados de manejo (BERG, 2009; BABALOLA et al., 2010).

2.3 ASPECTOS ECONÔMICOS DA INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

O nitrogênio é o elemento mais importante para elevar a produção na agricultura. As gramíneas são altamente exigentes deste nutriente para alcançar alta produtividade, e de maneira geral, trigo, milho e arroz utilizam nos diferentes estágios fenológicos da cultura, cerca de 20 a 40 Kg ha⁻¹ de N por tonelada de grão produzido (ORR, JAMES e LEIFERT, 2011). Moreira et al. (2010), relataram que os ganhos de nitrogênio em gramíneas via fixação biológica de nitrogênio giram em torno de 25 a 50 Kg de N ha⁻¹ ano⁻¹, o que corresponde ao suprimento médio de cerca de 17% demanda nutricional da cultura.

Desta forma, a utilização de fertilizantes químicos nitrogenados em gramíneas constitui um dos mais altos custos da agricultura, devido a quantidade utilizada. Pelo fato de extensas áreas serem ocupadas por cereais, a FBN por bactérias associadas às gramíneas torna-se de extrema importância para uma agricultura sustentável, mesmo que apenas parte de suas necessidades de N possa ser suprida (HUNGRIA, 2011; SANTI, BOGUSZ e FRANCHE, 2013). Estima-se que no mundo, a FBN contribua com 32 t ano⁻¹ em áreas cultivadas, correspondendo a 30% do nitrogênio produzido na forma de fertilizantes no planeta (FILOSO et al., 2006).

Hungria et al. (2010) em seu trabalho com inoculação de diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho (*Zea mays* L.) e do trigo (*Triticum aestivum* L.) no Sul do Brasil, verificaram que as estirpes Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 aumentaram o rendimento de grãos de milho em 662-823 Kg ha⁻¹, ou seja 24 a 30%, em comparação com a testemunha sem inoculação. Já no trigo, as estirpes Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V8 foram as mais eficientes, com incremento de 13 a 18% na produção (312-423 Kg ha⁻¹, respectivamente). Os mesmos autores ainda constataram que a combinação de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 aumentou a produção de milho (27%) e de trigo (31%). Este estudo resultou na recomendação da primeira estirpe de *Azospirillum* autorizada para a produção comercial de inoculantes no Brasil.

Experimentos foram realizados no Oeste do Estado do Paraná com o intuito de avaliar a inoculação de estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7), na cultura do milho, os quais demonstraram que a inoculação das sementes com a estirpe Ab-V7, e a associação entre as estirpes Ab-V5 + Ab-V6, Ab-V6 + Ab-V7 e Ab-V5 + Ab-V6 + Ab-V7 promoveram incrementos nos componentes da produção e na produtividade da cultura do milho (PINTO JUNIOR, 2013).

Sala et al. (2007) avaliaram em condições de campo, o efeito e a viabilidade econômica da inoculação de novos isolados homólogos de bactérias diazotróficas (*Azospirillum brasilense*, *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera*). Sob diferentes doses de nitrogênio e em dois genótipos de trigo, os autores verificaram aumento de produção com a inoculação dessas estirpes na ausência de N (em cobertura) sem observar especificidade das bactérias aos genótipos de trigo, porém o local de cultivo influenciou as respostas obtidas com a inoculação.

Ferreira et al. (2010) relatam que a resposta à inoculação é dependente da interação da cultivar com a estirpe contida no inoculante, onde verificaram que a variedade de trigo BR 296 respondeu a inoculação de *Azospirillum brasilense*, enquanto que BR 276 não respondeu a inoculação. Os mesmos autores ainda observaram que o aumento da dose de fertilizante nitrogenado interferiu na resposta da planta à inoculação com *A. brasilense*. A inoculação de *Azospirillum* com menor quantidade de N foi 22% superior na produtividade de trigo, em experimentos de campo realizados no México (CABALLERO-MELLADO, CARCAÑO-MONTIEL e MARCARÚA-ESPARZA, 1992).

Pelo fato da interação entre bactérias diazotróficas e gramíneas não ocorrer de forma visível, como na interação entre rizóbios e leguminosas, os dados econômicos sobre os efeitos da FBN em gramíneas são inconstantes, e não quantificados adequadamente (FIGUEIREDO et al., 2010). A especificidade na interação entre a bactéria, a espécie vegetal, os genótipos envolvidos, as condições nutricionais, assim como de fatores abióticos do meio ambiente, contribuem para a incerteza desta quantificação (MOREIRA et al., 2010).

Em trabalho comparando a inoculação de diferentes espécies de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em milho, Alves (2007), verificou que o gênero *Herbaspirillum* teve maior potencial para a promoção de crescimento na cultura em vários parâmetros avaliados. Em outro trabalho, Alves e Reis (2011) constataram um incremento de 250% com a inoculação de *H. seropedicae* em dois genótipos de milho testados. Araújo et al. (2013), ao avaliarem 35 genótipos de comerciais de milho entre híbridos e variedades, constataram que apenas 9 híbridos apresentam ganhos de crescimento ou acúmulo de N com a inoculação das sementes com a estirpe *H. seropedicae*.

Lopes et al. (2008) por sua vez avaliando o incremento de produtividade de milho na safra e safrinha, constataram que na safra tanto a variedade testada como o híbrido apresentaram comportamentos diferentes em resposta a inoculação de *H. seropedicae*, e que somente na safrinha houve resposta positiva a inoculação da bactéria. Já Dotto et al. (2010) verificaram que a inoculação de *H. seropedicae* não influenciou as variáveis analisadas, contudo, cada híbrido apresentou comportamentos distintos sobre a massa de espiga e a produtividade de grãos.

Diante disso, pesquisas que avaliem o comportamento dos microrganismos aplicados a campo e as condições próprias de cada região agrícola, bem como as interações planta-bactéria presentes, são imprescindíveis para o estabelecimento e a recomendação de produtos biotecnológicos, como biofertilizantes e/ou bioinoculantes, que maximizem o potencial de produção pela FBN (KUSS, 2006) e promoção de crescimento vegetal (SINGH; PANDEY e SINGH, 2011).

2.4 ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE DAS RIZOBACTÉRIAS

A microbiota do solo sofre um enorme impacto físico e biológico devido à intensa atividade das raízes das plantas. Os processos que ocorrem entre as raízes e os microrganismos do solo são determinados pela disponibilidade e ciclagem de nutrientes, e pela solubilização de elementos para as plantas e microrganismos, criando na rizosfera um microecossistema, que pode exibir propriedades completamente diferentes em comparação com o solo vizinho e não diretamente influenciado pela atividade das raízes (NEUMANN; GEORGE e PLASSARD, 2009).

Nesse sentido, as rizobactérias (bactérias que se associam às plantas colonizando suas raízes) estão presentes em todos os ambientes terrestres, colonizando o interior e exterior de órgãos de plantas, de maneira benéfica, neutra ou prejudicial ao seu crescimento (MARIANO et al., 2004). Com base na sua relação com o hospedeiro, as rizobactérias podem ser divididas em dois grupos: o primeiro das bactérias endofíticas que são geralmente definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis; e o segundo composto pelas bactérias fitopatogênicas (AZEVEDO, 1998).

No entanto, essa separação não é definitiva, uma vez que as relações entre planta-bactéria dependem de fatores como as condições ambientais ou do equilíbrio com as outras populações bacterianas e interações genótipo-genótipo. Assim, uma bactéria endofítica pode colonizar somente a rizosfera de determinada espécie vegetal, ou ainda, uma bactéria epífita pode entrar na planta, tornando-se endofítica ou patogênica (ANDREWS; HARRIS, 2000).

De acordo com Barriuso et al. (2008) as rizobactérias podem ser classificadas em quatro principais grupos: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., Rizóbios e Diazotróficos.

O grupo dos *Bacillus* spp. é constituído por 95% dos gram-positivos presentes no solo, os outros 5% representam os gêneros *Arthrobacter* spp. e *Frankia* spp. (GARBEVA; VEEN e ELSAS, 2003). Algumas espécies de *Bacillus* têm sido isolados a partir da rizosfera de Poaceas, e verificado seu potencial na promoção do crescimento (MAVINGUI et al., 1992). O gênero *Pseudomonas* spp. é o mais abundante e com elevada diversidade ecológica na rizosfera, sendo caracterizadas como gram-negativas, e frequentemente isoladas de raízes de diversas plantas (COELHO et al., 2007).

Os rizóbios são bactérias de modo geral gram-negativas, que após se estabelecerem dentro de nódulos radiculares de leguminosas, fixam nitrogênio atmosférico, bem como apresentam capacidade de promoção de crescimento quando associados às raízes de plantas não leguminosas em uma relação não-específica (BHATTACHARJEE et al., 2012). Este grupo é composto por vários gêneros como: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* (BHATTACHARJEE; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2008).

Os diazotróficos compreendem os microrganismos procariotos, incluindo representantes das arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas, dentre elas as bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal, que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. As bactérias diazotróficas de vida livre ou endofíticas apresentam grande diversidade de espécies e a associação com as plantas garantem esses microrganismos a capacidade para se adaptarem em condições adversas, em diferentes habitats terrestres (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Diversas espécies de bactérias diazotróficas têm sido isoladas do solo ou de raízes e/ou parte aérea de várias espécies de importância agrícola e econômica (Tabela 2).

Tabela 2. Isolamento de bactérias diazotróficas do solo e de raízes e/ou parte aérea de diversas espécies de importância agrícola e econômica

Isolamento	Referência
Solo	Giuntini et al., 2006 Beneduzi et al., 2008b Silva e Melloni, 2011 Neiverth, 2012 Rashid, Charles e Glick, 2012
Gramíneas	Khalid, Arshad e Zahir, 2004 Sala et al., 2005 Rodrigues et al., 2006 Roesch et al, 2007 Beneduzi et al., 2008a Beneduzi et al., 2008b Pedrinho, 2009 Magnani, 2010 Arruda et al., 2013 Beneduzi et al., 2013 Ji, Gururani e Chun, 2013
Tubérculos	Teixeira, Melo e Vieira, 2005 Dawwan et al., 2013
Orquidáceas	Lange e Moreira, 2002 Galdiano Jr et al., 2011
Cafeeiros	Jiménez-Salgado et al., 1997 Santos, Cristales e Mellado, 2001
Canola	Farina et al., 2012
Araucárias	Neroni, 2007
Eucaliptos	Ferreira et al., 2008
Frutíferas	Weber et al., 1999 Lacava et al., 2006 Bernardes, 2010

Segundo Moreira et al. (2010), a ocorrência de diazotróficos associativos até então descritas pode ser representada pelas seguintes espécies: *Azotobacter chroococcum*, *Azorhizophilus* (syn. *Azotobacter*) *paspali*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *Leptchloa fusca*, *A. irakense*, *A. doebereineriae*, *Miscanthus* spp., *A. oryzae*, *A. mellis*, *Melinis minutiflora*, *A. canadense*, *A. zaeae*, *Alcaligenes faecali*, *Azoarcus indigens*, *A. communis*, *Paenibacillus durus* (syn. *Bacillus azotofixans*), *Bacillus* spp., *Bacillus megaterium*, *B. cereus* e *B. licheniformis*, *Paenibacillus brasilensis*, *Beijerinckia fluminensis*,

Beijerinckia spp., *Burkholderia vietnamiensis*, *B. kururiensis* (syn. *B. brasiliensis*) *B. tropica* (syn. *B. tropicalis*), *B. unamae*, *B. silvatlantica*, *B. terrae*, *B. ginsengisoli*, *Arcobacter* (syn. *Campylobacter*) *nitrofigis*, *Derxia* spp, *Enterobacter* spp. (*agglomerans*, *cloacae*, *aerogenes*), *Gluconacetobacter* (syn. *Acetobacter*) *diazotrophicus*, *Gluconacetobacter johannae* e *G. azotocaptans*; *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum* (syn. *Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum frisingense*, *Klebsiella* spp. (*K. planticola*, *K. oxytoca*) e *Sphingomonas paucimobilis*.

Segundo Neiverth (2012), os estudos sobre a biodiversidade de bactérias do solo e de rizobactérias são essenciais e de extrema importância para proporcionar avanços no conhecimento das populações rizobacterianas e suas aplicações na agricultura, proteção do ambiente e na biotecnologia.

2.5 PRINCIPAIS MÉTODOS EMPREGADOS NO ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS

A taxonomia bacteriana é usada para classificar as bactérias, ou seja estabelecer relações entre um grupo e outro de microrganismos e os diferenciar. Essa classificação pode ser obtida com base em similaridades das sequências de nucleotídeos no DNA (TORTORA; FUNKE e CASE, 2012).

De maneira geral, a sistemática foi baseada principalmente na caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica das bactérias e mais recentemente por análise molecular (PELCZAR JR; CHAN e KRIEG, 1997). Dentre os métodos utilizados, a capacidade de utilização de diferentes fontes de carboidrato, temperatura de crescimento e a presença de determinadas enzimas, são os que se destacam. Porém um único método pode não ser útil, sendo necessário um conjunto de testes para diferenciar os grupos bacterianos (BUSSE; DENNER e LUBITZ, 1996).

A caracterização morfológica se dá principalmente pelo tamanho, forma, arranjo e presença de estruturas como flagelos, por meio de diferentes tipos de microscópios e métodos de coloração, sendo a coloração de Gram a mais utilizada (PELCZAR JR; CHAN e KRIEG, 1997).

Os testes bioquímicos, ou provas bioquímicas para identificação de bactérias, são dividido em dois grupos: metabolismo e atividade enzimática, sendo os principais a fermentação de carboidratos, teste da catalase, teste de utilização de citrato, presença de descarboxilases, teste da urease, produção de H₂S (gás

sulfídrico), teste do indol, redução de nitrato e hidrólise do amido (VERMELHO et al., 2006). A caracterização bioquímica utilizando-se o sistema API (*Appareils et Procédes d'Identification*), um kit para avaliar as características fenotípicas e bioquímicas de bactérias, tem sido usados em vários trabalhos como forma de identificar e diferenciar os isolados (FERNANDES; FERNANDES e RODRIGUES, 2001; ESTRADA et al., 2002; ASIS JR e ADACHI, 2003; MAGNANI, 2005).

Além dos testes mencionados, para identificação de BPCV são realizados testes bioquímicos específicos (CATTELAN, 1999). Entre estes estão a atividade da ACC-deaminase (GLICK, 2005; SHAHAROONA; ARSHAD e ZAHIR, 2006; GLICK et al., 2007; SALEEM et al., 2007); o ensaio da redução do acetileno (ARA) para determinação da atividade da nitrogenase (ASIS JR e ADACHI, 2003; TAN et al., 2009; MAGNANI et al., 2010; BARUA et al., 2012;); a determinação da solubilização de fosfato (BENEDUZI et al., 2008b; FURNKRANZ; MULLER e BERG, 2009; MARRA et al., 2012; ARRUDA et al., 2013; DAWWAM et al. 2013); a determinação da solubilização de sideróforos (D'ONOFRIO et al., 2010; BENEDUZI et al., 2013); a produção de fitormônios (PEDRAZA et al., 2004; CERIGIOLI, 2005; MARCHIORO, 2005; FENG; SHENG e SONG, 2006; KUSS et al., 2007; MENDES et al., 2007; EGAMBERDIEVA et al., 2008; ALI et al., 2009; KROME et al., 2010; PEDRINHO et al., 2010).

Porém, o posicionamento taxonômico mais preciso é possível com a utilização de técnicas moleculares, que tornou possível a avaliação das relações filogenéticas entre estirpes (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994). Segundo Kirchoff et al. (1997), a identificação de novos isolados por meio de critérios puramente fenotípicos e fisiológicos é extremamente difícil. Por esse motivo é importante a utilização de diferentes métodos, principalmente a nível molecular, para posicionar taxonomicamente novas estirpes que são isoladas.

Por meio de marcadores moleculares e amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou a reação em cadeia da polimerase), o gene ribossomal 16S rDNA, tem sido usado para construir um esboço da árvore evolutiva de bactérias. A partir do produto da PCR, tem se realizada diversas análises moleculares, como a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – *Amplified Ribossomal 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 sequências repetitivas de DNA (*rep*-PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP-PCR), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), MLST (*Multilocus Sequence Typing*, tipagem por sequenciamento de lócus múltiplos) e ainda MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994; WIDJOJOATMODJO, FLUIT e VERHOEF, 1994; STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999; REIS JR et al., 2002; STACKEBRANDT et al., 2002; VIDEIRA; ARAÚJO e BALDANI, 2007; WOO et al., 2007; SUN et al., 2008; GUEYE et al., 2009; PRAKAMHANG et al., 2009; NEIVERTH, 2012; SRINIVASA, SHARANAIAH e SHIVAMALLU, 2012).

Até pouco tempo, os genes ribossomais eram sequenciados de forma parcial (YOUNG; DOWNER e EARDLY, 1991) ou ainda, empregadas técnicas como PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição) (GERMANO et al., 2006; BRUGGER et al., 2012). No entanto, atualmente com equipamentos de última geração e a redução no custo do sequenciamento, tem-se incentivado a utilização de sequenciamento de genes para determinações filogenéticas, como o gene 16S ou genes *Nif* funcionais em bactérias diazotróficas (FURNKRANZ; MULLER e BERG, 2009; MAGNANI, 2010; PEDROSA et al., 2011; RASHID; CHARLES e GLICK, 2012; MONTAÑEZ et al., 2012; BENEDUZI et al., 2013; JI; GURURANI e CHUN, 2013).

A partir das sequências do gene 16S rDNA ou *Nif* as mesmas são comparadas com sequências do banco de dados público, como o GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o RDP (*Ribosomal Database Project* - <http://rdp.cme.msu.edu>) (MAGNANI, 2005).

Com base no sequenciamento do gene do DNA ribossomal 16S de bactérias cultivadas, são reconhecidos atualmente 6.466 espécies que estão distribuídas em 26 filos, 41 classes, 88 ordens, 240 famílias e 1194 gêneros (BRENNER et al., 2007). Entretanto, se forem considerados aqueles microrganismos que ainda não foram cultivados, mas que podem ser identificados por meio de técnicas de biologia molecular pode-se detectar até 52 filos bacterianos (RAPPE e GIOVANNONI, 2003). Brenner et al. (2007) afirmam que os grupos bacterianos mais frequentes encontrados na análise de diversidade são *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* que prevaleceriam sobre os outros grupos devido a facilidade de

cultivo dos mesmos ou devido ao sucesso no estabelecimento, competição, crescimento e desenvolvimento nos ecossistemas acessados.

Outra técnica recente é a do MALDI-TOF (ionização/dessorção da matriz assistida por laser – tempo de voo), por espectrometria de massa, que tem se mostrado uma ferramenta poderosa para uma rápida identificação de microrganismos (HENRIQUES, 2010; COLTELLA et al., 2013). Stets et al. (2013), compararam a técnica de MALDI-TOF e o sequenciamento do gene 16S rDNA, para avaliar a diversidade de bactérias associadas com plantas de trigo, e revelaram uma prevalência da Classe Gammaproteobacteria, com *Pseudomonas* e *Pantoea* como os principais grupos, e perceberam ainda que o perfil de MALDI-TOF pode fornecer uma resolução mais fina a nível de espécie em comparação com o sequenciamento do gene 16S rDNA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

As cultivares utilizadas como plantas iscas para o isolamento das bactérias foram CD 120 (trigo) e a IAPAR 114 (milho). A semeadura das plantas iscas de trigo ocorreu nos meses de junho e julho de 2011, e as plantas foram coletadas em agosto e setembro de 2011. As plantas iscas de milho foram semeadas no mês de setembro de 2011, e a coleta ocorreu em novembro de 2011. O plantio de ambas as culturas foi realizado em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná: área 1: Argissolo vermelho (Iporã/PR); área 2: Latossolo roxo (Linha La Salle-Palotina/PR) e área 3: Nitossolo vermelho (Linha Aparecidinha-Palotina/PR) classificados segundo Bhering e Santos (2008) (Figura 4).

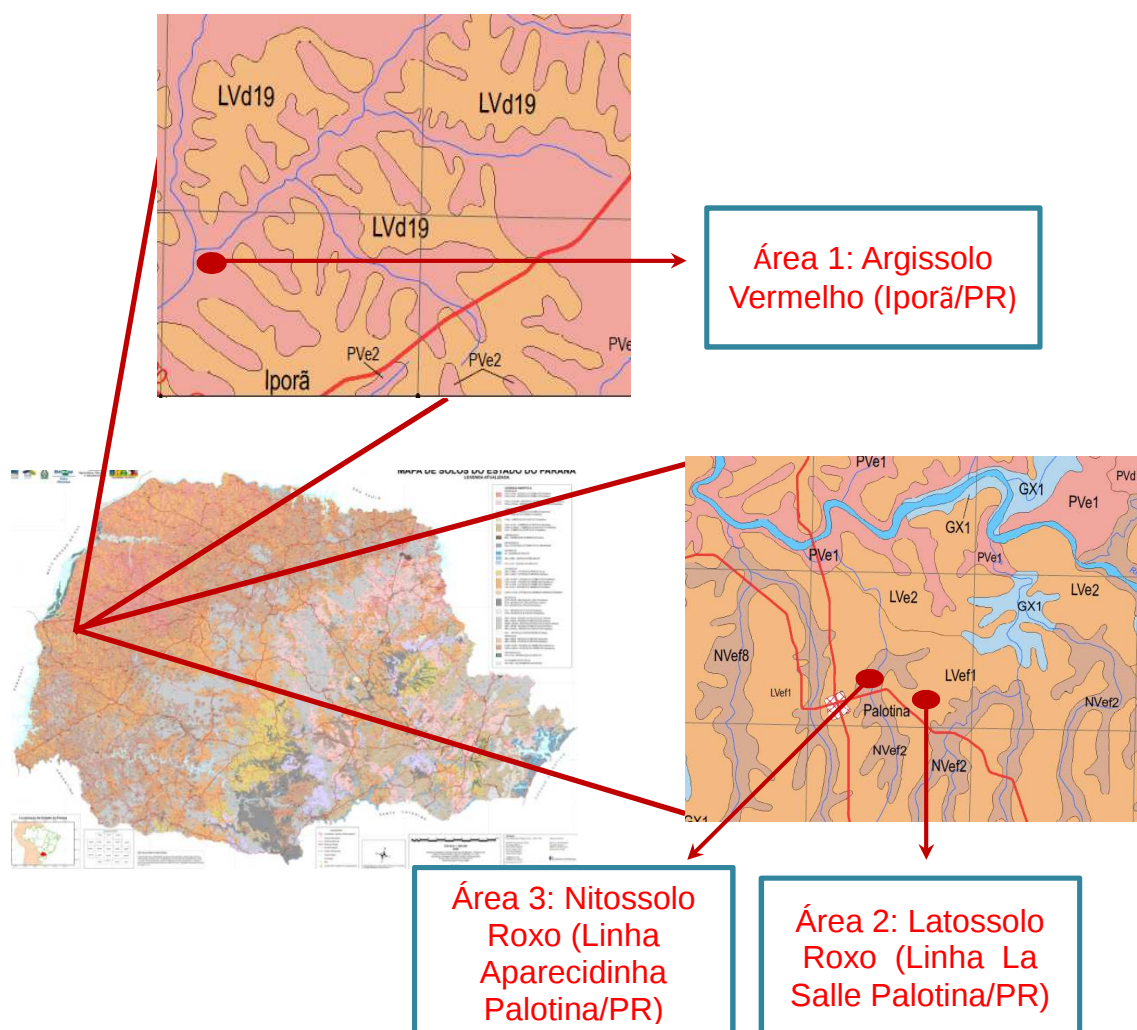


Figura 4. Localização das três áreas de coleta das plantas iscas.
FONTE: BHERING e SANTOS (2008)

Na tabela 3 estão as características físico-químicas da camada de 0-20 cm do solo dos diferentes locais de coleta.

Tabela 3. Características físico-químicas da camada de 0-20 cm do solo dos diferentes locais de coleta, Palotina/PR 2011

Solo	pH	MO g dm ⁻³	P mg dm ⁻³	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺ cmolc dm ⁻³	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	SB	V%	Argila %	Silte %	Areia %
A1	4,8	8,42	2,7	0,13	1,13	0,33	2,4	2,54	1,59	38,5	9,0	4,0	87,0
A2	5,2	14,74	44,7	0,23	2,08	0,79	0,0	3,18	3,10	49,3	18,0	22,0	60,0
A3	5,3	20,77	42,7	0,30	2,92	1,22	0,0	3,42	4,44	56,4	16,0	22,0	62,0

A1: área 1 - Argissolo vermelho (Iporã/PR); A2: área 2 - Latossolo roxo (Linha La Salle-Palotina/PR) e A3: área 3 - Nitossolo vermelho (Linha Aparecidinha-Palotina/PR). Laboratório de Análise do Solo da Coodetec - Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola.

Decorrido os 60 dias da germinação, de cada localidade foram retiradas as plantas, e levadas ao Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina.

No laboratório, foram pesados em triplicata 1 g de raízes oriundas de um conjunto de várias plantas de cada local. As raízes foram lavadas em água corrente e em câmara de fluxo laminar imersas em etanol 70% por 30 s e em seguida em hipoclorito de sódio (produto comercial) 0,2% por 60 s, para então, ser realizada a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. As raízes foram maceradas em cadinho com 9 mL de solução salina (NaCl 0,9%), feito este procedimento, todo o conteúdo foi devolvido ao tubo de ensaio, configurando a primeira diluição 10⁻¹.

Posteriormente foram realizadas as diluições seriadas para o plaqueamento até a diluição 10⁻⁵. Cada diluição foi plaqueada (0,1 mL) em meio de cultura sólido (Anexo A), com o auxílio de uma alça de Drigalski, DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA; VICTOR, 1986) e os semi-seletivos: NFb, JNFb, LG, LGD, LGI, LGI-P (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 30°C, com exceção do meio LGI em temperatura de 35°C ± 2°C, por até 7 dias. Foi realizado o repique das bactérias a cada 7 dias até a obtenção de culturas puras.

Após a obtenção das culturas puras, os isolados foram armazenados em frasco tipo penicilina contendo meio de cultura sólido inclinado (o mesmo que a bactéria foi isolada), e mantido em sala climatizada. As mesmas também foram guardadas em glicerol 50%, a -20°C.

As bactérias foram nomeadas segundo a planta isca e o tipo de solo de onde foram isoladas. Como exemplo: **UFPRPALT 1-1**, sendo **UFPR**: a universidade onde foram realizados os experimentos; **PAL**: por ser na cidade de Palotina/PR; **T** ou **M**: isolada da cultura do Trigo ou do Milho; **1**, **2** ou **3**: referente a área onde as plantas foram coletadas para o isolamento, área 1: Argissolo vermelho (Iporã/PR); área 2: Latossolo roxo (Linha La Salle-Palotina/PR) e área 3: Nitossolo vermelho (Linha Aparecidinha-Palotina/PR); **-nº** número da bactéria isolada.

3.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS ISOLADOS

A partir do isolamento, as bactérias foram caracterizadas de acordo com o meio de crescimento, temperatura de incubação, coloração da colônia, coloração de Gram e da forma das células bacterianas.

Para coloração de Gram foi utilizada a metodologia segundo Magnani (2005) onde uma única colônia isolada em placa foi retirada com o auxílio de um palito e espalhada numa lâmina de vidro com uma gota de solução salina estéril. A fixação da bactéria na lâmina ocorreu pela submissão ao fogo, seguida de adição de solução cristal de violeta e tratamento com lugol. A descoloração foi realizada com álcool-acetona, tratamento com fucsina por 30 s e visualização em microscópio.

A técnica da coloração de Gram consiste em diferenciar as bactérias em Gram-positivas ou Gram-negativas, pois sua parede celular possui formações químicas diferentes. Microrganismos Gram positivos se coram de roxo devido à capacidade em reter a coloração de cristal violeta após descoloração com álcool-acetona, por ter a parede celular composta por mureína (peptídeoglicano – peptídeo de ácido n-acetilmurâmico). Os Gram negativos por sua vez tem a parede celular composta predominantemente por ácidos graxos (lipopolissacarídeo e lipoproteína) e perdem o complexo iodo-pararosanilina, desta forma, são incapazes de reter a coloração violeta após o tratamento com álcool e quando contrastadas com um corante de cor diferente ficam rosa (TORTORA et al., 2012). Através desta técnica também é possível verificar a morfologia e o arranjo bacteriano.

3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Com as bactérias isoladas em colônias puras foi realizado o teste da solubilização do fosfato em meio de cultura NBRIP sólido (Anexo A), conforme metodologia proposta por Nautiyal et al. (2000). Em câmara de fluxo laminar, foi retirada uma alíquota da colônia bacteriana com o auxílio de um palito, e cada isolado foi inoculado em quatro pontos no meio NBRIP. Os pontos foram considerados repetições para cada isolado, que foram incubados em estufa a 28°C, por 6 dias. Decorrido este tempo foi realizada a avaliação da solubilização por meio da medição do diâmetro do halo de solubilização, e do halo da colônia com o auxílio de uma régua graduada.

A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) para cada isolado por meio da fórmula: $IS = f \text{ Halo (mm)} / f \text{ Colônia (mm)}$, sendo f o diâmetro do halo ou da colônia (BERRAQUERO, BAYA, CORMENZANA, 1976). Com base nos Índices de Solubilização obtidos, os isolados foram classificados como isolados com baixo ($IS < 2$), médio ($IS > 2$) e alto ($IS \geq 4$) potencial de solubilização de fosfato. Dentro de cada índice foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

A avaliação da produção do ácido indol-3-acético (AIA) dos isolados foi realizada da seguinte forma: os isolados foram inoculados em frascos de vidro (tipo penicilina) contendo meio DYGS com e sem suplementação de L-Triptofano (0,2 M). Os frascos foram incubados em estufa a 28°C sob agitação constante de 120 rpm, no escuro pelo período de 24 h, e os testes foram feitos em triplicata.

Após o período de cultivo, 2 mL do meio de cultura foi centrifugado à 10.000g (4°C) por 10 min. Em seguida, 1 mL do reagente de Salkowski (SARWAR; KRAMER, 1995) foi adicionado a 1,5 mL do sobrenadante. As amostras foram deixadas em repouso no escuro por 30 min para desenvolvimento da cor, que se apresenta rósea mais intensa quando há maior quantidade de ácido indol-3-acético (KUSS et al., 2007). A quantificação do AIA foi realizada por leitura de absorbância à 535 nm (ASGHAR et al., 2002), utilizando uma curva padrão de ácido indol-3-acético ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) diluída em água, em diferentes concentrações que variaram de 0 a $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, adicionadas ao reagente de Salkowski. O restante do sobrenadante foi vertido fora e o pellet foi congelado em freezer a -20°C para posterior determinação de

proteínas totais (LOWRY et al., 1951) com a finalidade de normalização das leituras de produção de AIA. Culturas bacterianas de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5 foram cultivadas sob as mesmas condições para serem consideradas como padrões.

Conforme proposto por Medrado (2011) os pellets foram descongelados em temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 1 mL de NaOH 0,1 M a cada amostra e, estas foram incubadas em banho-Maria por 10 min a 90°C para lise celular. Em seguida, foram submetidas à centrifugação, a 10.000 g e 4°C por 10 min. Uma alíquota de 200 µL foi retirada do sobrenadante para um microtubo onde adicionou-se 1 mL da solução A (Anexo A) que ficou agindo por 10 min para adição de 100 µL de Folin-Ciocalteu, e incubação por 30 min. A determinação de proteínas foi realizada por espectrofotometria a 660 nm.

A partir das curvas padrão e das absorbâncias de AIA e proteína de cada amostra, foram realizados os cálculos, através da razão entre a concentração final de AIA e a concentração final da proteína, expressos como µg AIA mg de proteína⁻¹. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

3.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.4.1 Extração de DNA Genômico

Para as análises moleculares, foi realizada a extração de DNA genômico bacteriano no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina. O DNA genômico bacteriano foi extraído seguindo protocolo proposto por Cheng e Jiang (2006), onde as estirpes bacterianas foram crescidas em meio DYGS líquido, sob agitação constante de 120 rpm, por 16 h. Alíquotas (2 mL) da cultura foram pipetadas e centrifugadas em micro tubos a 9.000 rpm por 2 min. Ao pellet foi adicionado 400 µL de STE (100mM de NaCl; 10 mM de Tris HCl pH 8.0 e 1,0 mM de EDTA pH 8.0) que foi ressuspensionado e centrifugado por 2 min. Na etapa seguinte, novamente o pellet foi ressuspensionado em 200 µL de tampão TE (10 mM de Tris HCl pH 8.0 e 1 mM de EDTA pH 8.0) e com a adição de 100 µL de fenol saturado. Após agitação em vortex por 1 min as amostras

foram centrifugadas por 5 min a 12.000 *g* e 4°C para separar a fase aquosa da fase orgânica. Alíquotas de 160 µL da fase aquosa foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL, adicionadas 40 µL de tampão TE e 100 µL de clorofórmio, que foram em seguida centrifugadas por 5 min a 12.000 *g* sob refrigeração, sendo esta etapa repetida por duas vezes. A seguir, a 160 µL da fase aquosa foram adicionados 40 µL de tampão TE e 5 µL de RNase (10 mg mL⁻¹), seguindo incubação a 37°C por 10 min para digestão do RNA. Posteriormente, foi acrescentado 100 µL de clorofórmio e as amostras foram centrifugadas sob refrigeração por 5 min a 12.000 *g*. A fase aquosa (cerca de 150µL) foi coletada e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. O DNA purificado foi armazenado em freezer a -20°C. Para verificar a pureza do DNA, o mesmo foi quantificado e padronizado em espectrofotômetro A260/A280, e submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8% (70 V por aproximadamente 1 h) em tampão TBE (Tris-ácido bórico EDTA).

3.4.2 Amplificação do Gene 16S rDNA

Para a amplificação do gene 16S rDNA foi utilizada a técnica de PCR utilizando-se um termociclador VERITI *Applied Biosystems*. Esta etapa e a etapa de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado foram realizadas na empresa COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola) de Cascavel.

Para uma reação de PCR com volume final de 30 µL, foi utilizado 3 µL Tampão da Taq 10x; 2,25 µL de 25 mM de MgCl₂; 1 µL de 10 mM de cada desoxiribonucleotídeo; 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (primer Y1 e Y3 na concentração de 4mM); 2 µL de Taq DNA polimerase; 2 µL de DNA (50 a 100 ng) e água milli-Q estéril para completar um volume final de 30 µL. As amostras foram amplificadas de acordo com o seguinte programa: 93°C, por 2 min; 35 ciclos de 93°C por 45 s, 62°C por 30 s, 72°C por 2 min, seguidos de uma extensão final por 5 min, a 72°C.

Para confirmação da amplificação, 5 µL da reação + 2 µL do corante IV (Anexo A) foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE, juntamente com 3,5 µL do marcador de peso molecular de 100 pb. A eletroforese foi desenvolvida por aproximadamente 1 h e fotodocumentada (aparelho Locus Biotecnologia L.PIX).

3.4.2.1 Oligonucleotídeos Iniciadores Utilizados

Nas reações de amplificação do gene 16S rDNA foram usados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Young; Downer e Eardly (1991): Y1-Y3 (Figura 5). O Y1f (TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) anela na ponta 5' do gene 16S rDNA e o Y3r (TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC) na 3', gerando um produto de amplificação que compreende quase todo o gene, de aproximadamente 1,5 Kb.

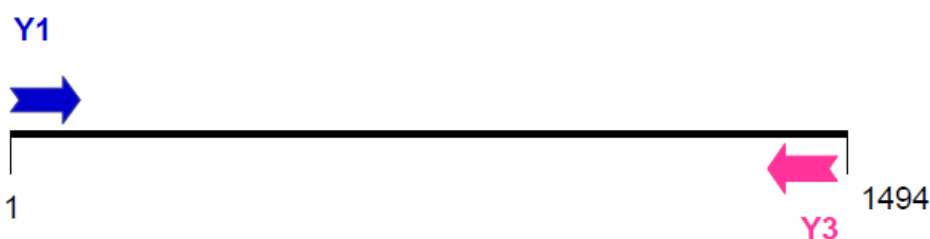


Figura 5. Esquema de anelamento dos oligonucleotídeos na região Y1-Y3 do gene 16S rDNA.

Fonte: MAGNANI, 2005.

3.4.3 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado

Após a obtenção dos produtos da PCR, foi utilizada a técnica de restrição do DNA ribossomal amplificado (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis* - ARDRA). A técnica envolve a amplificação enzimática utilizando iniciadores dirigidos para as regiões conservadas nas extremidades do gene 16S, seguido por digestão usando enzimas de restrição, onde se pode analisar o perfil de fragmentos gerados a partir desta digestão (FIGUEIREDO et al., 2010). Desta forma, após a obtenção do produto da PCR do gene 16S, os mesmos foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: *Rsa I*, *Hae III*, *Hinf I*, para a análise de similaridade entre os isolados.

Para uma reação com cada uma das enzimas de restrição, com volume final de 10 µL, foi utilizado 1 µL de Tampão da enzima; 0,6 µL da enzima e 5 µL do produto da PCR (16S amplificado) e água milli-Q estéril para completar um volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas à 37 °C por 4 h. Para verificação do padrão de bandas geradas por cada uma das enzimas, os 10 µL da reação + 4 µL do corante IV foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2% em

tampão TBE, juntamente com 3,5 µL do marcador molecular de 100 pb. A eletroforese foi desenvolvida 60V por aproximadamente 2 h e fotodocumentada (aparelho Locus Biotecnologia L.PIX).

Os resultados de polimorfismo foram utilizados para análise de agrupamento por similaridade entre os isolados, através dos dados obtidos da análise do total das bandas de todos os perfis gerados pelas três enzimas de restrição, por transformação em uma matriz binária, sendo: 0 (ausência de banda) e 1 (presença de banda).

Com os dados coletados foi estimada a distância genética entre os isolados, estimada pelo método de Jaccard, e em seguida agrupados pelo método das distâncias médias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), sendo os mesmos representados graficamente por um dendograma gerado com o auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2008).

3.4.4 Sequenciamento do Gene 16S rDNA

A técnica de sequenciamento de fragmentos de genes possibilita a avaliação direta de polimorfismos de DNA, sendo este um dado utilizado para determinar a relação de parentesco entre indivíduos e populações, bem como inferências filogenéticas. Para a reação de sequenciamento foi realizada a extração e amplificação do DNA de cada isolado, conforme descrito nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

O sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rDNA dos diferentes isolados foram sequenciados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, *Campus* de Curitiba. Estes foram purificados com enzimas *exo/SAP*, da seguinte maneira: 1 µL da enzima *exo* (3,3U), 1 µL da enzima *SAP* (0,66U) e 1 µL de água milli-Q estéril, em 20 µL de DNA (16S amplificado). As amostras foram dispostas em placa de 96 poços com 3 µL do mix + 20 µL de DNA para cada amostra, que foram levadas ao termociclador por 60 min a 37°C, 15 min a 80°C e finalmente mantendo 4°C.

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados 1,5 µL de DNA (400-600 ng), 2,5 µL do oligonucleotídeo iniciador (primer Y1 a 10 pmol), 1 µL de reativo de sequenciamento Big Dye terminator, 3 µL do Tampão *Save Mone* e 2 µL de água milli-Q estéril, num volume final de 10 µL. As amostras foram dispostas em placas de 96 poços, com 8,5 µL do mix + 1,5 µL de DNA, para cada amostra.

Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 1 min a 96°C, seguido por 30 ciclos de 96°C por 15 s, 60°C por 15 s e 60°C por 4 min. Após a amplificação, foi realizado o protocolo de precipitação, onde numa nova placa de 96 poços para cada amostra foram adicionados 10 µL da amostra amplificada, 2 µL de acetato de amônio (7.5 M) 3 volumes (66 µL) de etanol absoluto e 10 µL de água Milli-Q. Esta placa foi colocada em gelo por 10 min, e centrifugada (3700 rpm a 20°C) por 30 min. Decorrido o tempo, as amostras foram vertidas em papel absorvente e então lavadas com 100 µL com etanol 70%. Esta etapa foi repetida e as amostras foram deixadas para secar sob vácuo (cerca de 30 min). Após a secagem, as amostras foram tratadas com 10 µL de HiDi formamida e levadas para o aparelho de sequenciamento ABI3500 xL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems - HITACHI).

3.4.4.1 Análise das Sequências do Gene 16S rDNA

As sequências obtidas pelo sequenciador ABI3500 xL saíram no formato do programa *ab1 sequencing analyses*, no formato FASTA – *Fast All* (alinhamentos rápidos para toda a informação biológica, disponível on-line no NCBI), e foram analisadas pelo programa *Seqmatch* que serve para classificar taxonomicamente as sequências de acordo com a taxonomia bacteriana proposta no Bergey's Trust ou como classificadas pelo NCBI- disponível no site RDP (*Ribosomal Database Project* - <http://rdp.cme.msu.edu>).

Para a busca de similaridade, foi realizada a análise dos dados através do programa BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL, 1997) usando o banco de dados do GenBank), disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov). Através do BLAST foi possível determinar a identidade das sequências dos isolados através de alinhamentos locais entre as regiões da sequência desconhecida (a que se deseja pesquisar) e sequências existentes do banco de dados para o gene 16S. O resultado é uma lista de sequências com o nome do gene e o organismo a qual ele pertence, ou seja, de maior identidade. A qualidade do alinhamento é dada pelo valor *score*, e um *valor E*, que indica a probabilidade daquele alinhamento ter sido ao acaso e não devido a uma relação entre as sequências (MAGNANI, 2005).

3.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE TRIGO

O experimento de inoculação de bactérias *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN), da Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina. Foram testadas seis estirpes bacterianas obtidas no ensaio de isolamento: UFPRPALT 1-1; UFPRPALT 1-14; UFPRPALM 2-77; UFPRPALM 3-87; UFPRPALM 1-121; UFPRPALM 1-122, bem como as bactérias *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, e o controle, sem inoculação.

As bactérias foram mantidas por sucessivas repicagens em meio sólido específico de isolamento, e incubadas em estufa a 28°C. Para padronização da fase exponencial (*log*) de crescimento bacteriano foi realizada uma curva de crescimento em meio DYGS líquido, para todas as bactérias usadas neste ensaio. Esta análise foi realizada através da D.O. a 660 nm e da contagem de células bacterianas pela metodologia da microgota proposta por Romeiro (2001).

Para o preparo do inóculo, uma colônia de cada bactéria foi transferida para um pré-inóculo contendo 5 mL de meio DYGS líquido em tubo Falcon de 50 mL mantido a 28°C em uma incubadora do tipo Shaker a 120 rpm, *overnight*. Decorrido este tempo, 1 mL do pré-inóculo, foi transferido para erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL do meio DYGS líquido, até alcançarem a fase *log* de crescimento. Após o crescimento, a massa de células foi quantificada por turbidimetria a 660 nm. Para a inoculação foi necessária adequação do cálculo para a concentração $1 \cdot 10^6$ células mL⁻¹ em 50 sementes. As células bacterianas suficientes para o inóculo foram centrifugadas, ressuspendidas em salina (0,9%) e inoculadas nas 50 sementes.

Para o ensaio *in vitro*, 50 sementes do genótipo de trigo (*Triticum aestivum* L.) cv COODETEC (CD 120) foram lavadas em solução de hipoclorito acidificado (Anexo A) por 20 min (em agitação), seguidas por 3 lavagens em água destilada e autoclavada. Posteriormente, na câmara de fluxo laminar, as sementes foram colocadas em Placa de Petri com papel filtro embebido em água. As placas foram envolvidas em papel alumínio e permaneceram durante a noite.

As sementes pré-germinadas foram inoculadas por imersão (2 h) em suspensão bacteriana preparadas como descrito anteriormente, e transferidas para tubos de ensaio contendo 20 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) líquido sem adição de nitrogênio (NH_4NO_3 e KNO_3) e pH ajustado para 5.8 (Anexo A). Nos tubos foram acrescentadas bolinhas de polipropileno, formando uma camada de 5 cm, servindo como suporte para as sementes, de modo que não fiquem submersas no meio de cultivo. Cada tubo recebeu uma semente pré-germinada com 10 repetições por tratamento. Estes ficaram em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 h de luz/ 8 h de escuro, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por 5 dias.

Decorrido os 5 dias de cultivo, 3 plântulas de cada tratamento foram retiradas dos tubos e as parte aéreas foram separada das raízes. Ambas foram medidas (cm) com régua graduada, para obtenção da altura e comprimento de raiz e em seguidas estas foram pesadas (mg) com balança analítica, para a determinação da massa fresca de parte aérea e de raiz. As mesmas amostras foram deixadas em estufa de secagem com circulação forçada a 65°C por 48 h, para a obtenção da massa seca de parte aérea e de raiz.

Amostras de massa seca de parte aérea foram utilizadas para a análise do teor de Nitrogênio Total (Kjeldahl) de acordo com o método descrito por Bremner e Mulvaney (1982), realizado com 3 repetições por tratamento. Foram pesados 100 mg da amostra seca, moído em moinho tipo Willye, em tubos de ensaio próprios para adaptar-se no destilador de proteína Kjeldahl. Foram adicionados 1 g da mistura digestora previamente preparada e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, os tubos foram levados para a chapa digestora de proteína onde teve início à digestão a 50°C , e a cada 30 min foram elevados 50°C da temperatura, até atingir 400°C (SILVA, 2002).

Para a destilação foram usados erlenmeyers de 125 mL com 10 mL de H_3BO_3 previamente preparado. Uma solução de NaOH 50% foi adicionada e deixado destilar até o volume de 50 mL. Na titulação foi utilizado uma bureta com HCl a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ previamente titulado e com fator de correção conhecido, liberando-se HCl até o ponto de viragem de verde claro para róseo.

O cálculo utilizado para a determinação do percentual de nitrogênio (N) foi:

$$\%N = V \cdot N \cdot f \cdot 14 \cdot 100 / \text{peso da amostra (mg)}$$

V = volume de HCl (mL);

N = normalidade

f = fator de correção

O valor obtido em %N foi transformado em g Kg⁻¹ (%N · 10).

Os parâmetros avaliados foram: altura da plântula (cm), comprimento de raiz (cm), massa fresca de parte aérea (mg), massa seca de parte aérea (mg), massa fresca de raiz (mg), massa seca de raiz (mg) e nitrogênio total (%), bem como a contagem de células bacterianas epifíticas e endofíticas.

Com exceção da contagem de células bacterianas, os demais dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

3.5.1 Contagem de Células Bacterianas Epifíticas e Endofíticas

Para a avaliação da contagem de células bacterianas epifíticas, 3 plântulas foram levadas para a câmara de fluxo laminar, onde tiveram as raízes separadas da parte aérea. Após, foram pesadas 0,1 g de raízes que foram colocadas em um tubo de ensaio com água destilada e autoclavada, em seguida imersas em outro tubo com 1 mL de solução salina (0,9%) e levadas ao sonicador por 1 min. A partir desta amostra, foram retiradas alíquotas de 100 µL e inoculada em microtubos, com 900 µL de salina (0,9%), até a diluição 10⁻⁸.

Na contagem de células bacterianas endofíticas, as mesmas raízes usadas na contagem epifítica, foram imersas em solução de Cloramina – T 1% por 30 s, posteriormente lavadas com água destilada e autoclavada. Em seguida, as raízes foram maceradas em 1 mL de solução salina (0,9%), e levadas ao sonicador por 1 min, e realizada a diluição seriada até 10⁻⁸. As diluições foram inoculadas numa única placa de Petri contendo meio DYGS sólido, sendo 3 microgotas (5 µL) por diluição, constituindo assim 3 repetições por tratamento (ROMEIRO, 2001), onde cada microgota foi considerada uma repetição e o valor final foi a média de 3 repetições. As placas foram colocadas em estufa de crescimento a 28°C, e após 16 h foi realizada a contagem de células bacterianas.

3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NA CULTURA DO TRIGO: ENSAIO DE INOCULAÇÃO EM VASO

Os experimentos em casa de vegetação para a cultura do trigo foram conduzidos na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, *Campus* Toledo (solo com alta fertilidade - AF) no mês de Abril de 2013 e na Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina (solo com baixa fertilidade - BF), no mês de Maio de 2013. Vasos contendo 4,5 Kg de solo previamente peneirado, e sem adubação química foram preparados com solo de alta fertilidade (AF) (Latossolo roxo) e de baixa fertilidade (BF) (Argissolo vermelho). As análises físico-química dos solos foram realizadas (Tabela 4), e com base nos resultados foi feita adubação de base com 400 Kg ha⁻¹ de NPK (4-20-20) e de cobertura com Sulfato de Amônio (NH₄SO₃): 50 Kg de N ha⁻¹.

Tabela 4. Análises físico-química da camada de 0-20 cm dos solos usados nos experimentos de inoculação com bactérias na cultura do trigo, Palotina/PR e Toledo/PR – 2013

Solo	pH	MO g dm ⁻³	P mg dm ⁻³	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	Fe mg dm ⁻³	SB	V%	Argila	Silte	Areia
BF	3,6	1,34	2,8	0,02	0,87	0,14	1,0	3,97	26,0	1,2	25,0	18,0	6,0	76,0
AF	6,1	42,9	14,0	1,14	6,42	4,23	0,0	3,18	19,0	11,7	78,7	63,0	20,0	17,0

BF – Baixa Fertilidade; AF – Alta Fertilidade. Laboratório de Análise do Solo da Coodetec - Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola.

Foram semeadas 5 sementes por vaso, com posterior desbaste aos 15 dias após a semeadura, deixando-se apenas 3 plantas por vaso. Os isolados utilizados neste experimento foram UFPRPALT 1-14; UFPRPALM 3-87 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5. O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 3.5.

Foram realizados três grupos de avaliações onde os tratamentos consistiram conforme apresentado na tabela 5. Cada tratamento foi realizado em triplicata, totalizando 39 vasos e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Tabela 5. Descrição dos tratamentos utilizados nos experimentos

Grupo	Tratamentos	Descrição dos tratamentos
I	T1	Controle sem inoculação e sem adubação
	T2	Inoculação <i>Azospirillum brasilense</i>
	T3	Inoculação <i>A. brasilense</i> + NPK
	T4	Inoculação <i>A. brasilense</i> + Sulfato de Amônio
	T5	Inoculação <i>A. brasilense</i> + NPK + Sulfato de Amônio
II	T1	Controle sem inoculação e sem adubação
	T2	Inoculação UFPRPALT 1-14
	T3	Inoculação UFPRPALT 1-14 + NPK
	T4	Inoculação UFPRPALT 1-14 + Sulfato de Amônio
	T5	Inoculação UFPRPALT 1-14 + NPK + Sulfato de Amônio
III	T1	Controle sem inoculação e sem adubação
	T2	Inoculação UFPRPALM 3-87
	T3	Inoculação UFPRPALM 3-87 + NPK
	T4	Inoculação UFPRPALM 3-87 + Sulfato de Amônio
	T5	Inoculação UFPRPALM 3-87 + NPK + Sulfato de Amônio

A rega e a aplicação do inseticida sistêmico pertencente aos grupos químicos Neonicotinóide (Imidacloprido) e Piretróide (Beta-ciflutrina) e do fungicida sistêmico pertencente aos grupos químicos Estrubirulina (Piraclostrobina) e Triazol (Epoconazol) foram realizados conforme a necessidade. O controle de plantas daninhas foi realizada manualmente.

Aos 30 dias após a semeadura foi realizada a adubação de cobertura com sulfato de amônio acrescentando-se 50 Kg de N ha⁻¹ em cobertura. A avaliação final da promoção de crescimento foi realizada aos 45 dias após a semeadura, através da avaliação da altura da planta, da massa fresca de parte aérea, da massa seca de parte aérea e dos teores de nitrogênio total do tecido foliar, como descrito no item 3.5.

Nos experimentos em vaso, a contagem de células bacterianas epifíticas foi realizada aos 45 dias após a germinação. Os vasos foram previamente molhados para facilitar a retirada das raízes. Destes, foram retiradas 3 plantas cuja parte radicular foi cortada e lavada em água corrente para retirar o excesso de solo. De

cada planta amostrada, foram pesadas 0,5 gramas e levadas para câmara de fluxo laminar, onde os procedimentos seguiram o protocolo descrito no item 3.5.1. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NA CULTURA DO MILHO: ENSAIO DE INOCULAÇÃO EM VASO

O experimento com inoculação de bactérias na cultura do milho foi implantado em Setembro de 2012, na Universidade Federal do Paraná, *Campus* Palotina. O experimento foi realizado em vasos com capacidade de 4,5 Kg. O solo utilizado foi Argissolo vermelho de baixa fertilidade (BF), coletado na região de Iporã/PR (Tabela 4). Com base na análise foi realizada a adubação de base (NPK) (4-20-20) na recomendação de 400 Kg ha⁻¹ e de cobertura (Sulfato de Amônio (NH₄SO₃): 50 Kg de N ha⁻¹), dependendo do tratamento.

Foram semeadas 5 sementes por vaso, com posterior desbaste aos 10 dias após a semeadura, deixando-se apenas 3 plantas por vaso. Os isolados utilizados neste experimento foram UFPRPALT 1-14; UFPRPALM 3-87 e *Azospirillum brasilense* Ab-V5. O preparo do inóculo foi realizado como descrito no item 3.5. Os grupos de tratamentos e as determinações das variáveis foram os mesmos utilizados na cultura do trigo (item 3.6).

Para a análise estatística os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (CRUZ, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os resultados referentes à caracterização parcial das estirpes bacterianas isoladas de plantas de milho (M) e de trigo (T) em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná: área 1: Argissolo vermelho (Iporã/PR); área 2: Latossolo roxo (Linha La Salle-Palotina/PR) e área 3: Nitossolo vermelho (Linha Aparecidinha-Palotina/PR), são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Caracterização parcial das 136 estirpes bacterianas isoladas de plantas de milho e trigo em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná, Iporã e Palotina/PR – 2011

Isolados	Meio de Cultura	Temperatura (°C)	Gram	Forma	Coloração da Colônia
UFPRPALT 1-1	LG	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-2	NFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-3	NFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-4	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-5	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-6	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-7	LGI-P	28 - 30	+	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-8	LGI-P	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-9	LGD	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALT 1-10	LGD	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-11	LGD	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-12	LGD	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALT 1-13	DYGS	28 - 30	-	Bacilos	amarela
UFPRPALT 1-14	DYGS	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALT 1-15	LGI	35 -37	-	Cocos	branca
UFPRPALT 1-16	LGI	35 -37	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 1-17	LGI	35 -37	-	Cocos	branca
UFPRPALT 2-18	LGI	35 -37	-	Cocos	branca
UFPRPALT 2-19	LGI	35 -37	+	Cocos	branca
UFPRPALT 2-20	LGI	35 -37	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 2-21	LG	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 2-22	LG	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 2-23	LG	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 2-24	LG	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 2-25	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	incolor

UFPRPALT 2-26	LGI-P	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALT 2-27	LGI-P	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALT 2-28	LGD	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 2-29	LGD	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 2-30	LGD	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 2-31	LGD	28 - 30	+	Cocos	incolor
UFPRPALT 2-32	LGD	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALT 2-33	NFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 2-34	NFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALT 2-35	JNFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALT 2-36	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 2-37	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 2-38	JNFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-39	LGI	35 -37	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-40	LGI	35 -37	-	Cocos	amarela
UFPRPALT 3-41	LGI	35 -37	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-42	LGI-P	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALT 3-43	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-44	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-45	LGI-P	28 - 30	-	Bacilos	amarela
UFPRPALT 3-46	LG	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 3-47	LG	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-48	LG	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-49	LGD	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALT 3-50	LGD	28 - 30	+	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-51	LGD	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALT 3-52	JNFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALT 3-53	JNFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-54	NFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALT 3-55	NFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-56	LGI	35 -37	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 3-57	LGI	35 -37	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-58	LGI	35 -37	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-59	LGI	35 -37	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-60	LGI	35 -37	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-61	LGI	35 -37	+	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-62	LGI	35 -37	-	Cocos	branca
UFPRPALM 2-63	LGI	35 -37	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-64	LG	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-65	LG	28 - 30	+	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-66	LG	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 3-67	LG	28 - 30	-	Cocos	amarela

UFPRPALM 2-68	LG	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 2-69	LG	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 3-70	LGD	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 3-71	LGD	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 3-72	LGD	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 3-73	LGD	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-74	LGD	28 - 30	-	Diplococos	incolor
UFPRPALM 2-75	LGD	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-76	LGD	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-77	LGD	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 3-78	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 3-79	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 3-80	LGI-P	28 - 30	-	Bacilos	amarela
UFPRPALM 3-81	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-82	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 2-83	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-84	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 2-85	LGI-P	28 - 30	-	Estreptococos	incolor
UFPRPALM 3-86	JNFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-87	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 3-88	JNFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 2-89	JNFb	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-90	JNFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 2-91	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 2-92	JNFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 2-93	JNFb	28 - 30	+	Bacilos	branca
UFPRPALM 2-94	JNFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 2-95	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 2-96	NFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 2-97	NFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-98	NFb	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 3-99	NFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 3-100	NFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 3-101	NFb	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 3-102	DYGS	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 3-103	DYGS	28 - 30	+	Bacilos	branca
UFPRPALM 3-104	DYGS	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 3-105	DYGS	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 2-106	DYGS	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 2-107	DYGS	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 2-108	DYGS	28 - 30	-	Cocos	creme
UFPRPALM 2-109	DYGS	28 - 30	-	Cocos	amarela

UFPRPALM 2-110	DYGS	28 - 30	-	Cocos	verde
UFPRPALM 1-111	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 1-112	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 1-113	LGI-P	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 1-114	LGI	35 -37	+	Cocos	amarela
UFPRPALM 1-115	LGI	35 -37	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 1-116	NFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 1-117	NFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 1-118	NFb	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 1-119	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 1-120	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 1-121	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 1-122	JNFb	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 1-123	JNFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 1-124	JNFb	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 1-125	LG	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 1-126	LG	28 - 30	+	Cocos	incolor
UFPRPALM 1-127	LGD	28 - 30	-	Bacilos	incolor
UFPRPALM 1-128	LGD	28 - 30	+	Bacilos	incolor
UFPRPALM 1-129	LGD	28 - 30	-	Cocos	incolor
UFPRPALM 1-130	LGD	28 - 30	-	Diplococos	incolor
UFPRPALM 1-131	LGD	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 1-132	LGD	28 - 30	-	Cocos	amarela
UFPRPALM 1-133	DYGS	28 - 30	+	Bacilos	branca
UFPRPALM 1-134	DYGS	28 - 30	-	Cocos	branca
UFPRPALM 1-135	DYGS	28 - 30	-	Bacilos	branca
UFPRPALM 1-136	DYGS	28 - 30	-	Cocos	branca

UFPRPALM 1 Bactérias isoladas de raízes de Trigo Área 1 (Argissolo vermelho – Iporã/PR)

UFPRPALM 2 Bactérias isoladas de raízes de Trigo Área 2 (Latossolo roxo – Linha La Salle-Palotina/PR)

UFPRPALM 3 Bactérias isoladas de raízes de Trigo Área 3 (Nitossolo vermelho – Linha Aparecidinha-Palotina/PR)

UFPRPALM 1 Bactérias isoladas de raízes de Milho Área 1 (Argissolo vermelho – Iporã/PR)

UFPRPALM 2 Bactérias isoladas de raízes de Milho Área 2 (Latossolo roxo – Linha La Salle-Palotina/PR)

UFPRPALM 3 Bactérias isoladas de raízes de Milho Área 3 (Nitossolo vermelho – Linha Aparecidinha-Palotina/PR)

Foram isoladas 136 estirpes bacterianas, sendo 17 bactérias isoladas de raízes de trigo na área 1 (Argissolo vermelho), 21 bactérias na área 2 (Latossolo roxo), 17 bactérias na área 3 (Nitossolo vermelho), 55 isolados no total. Tendo como plantas iscas o milho, 26 bactérias foram isoladas na área 1 (Argissolo vermelho), 28 bactérias na área 2 (Latossolo roxo) e 27 bactérias na área 3 (Nitossolo vermelho), 81 isolados no total.

Estas bactérias foram isoladas em diferentes meios de cultura semi-seletivos para diferentes gêneros de bactérias diazotróficas. Na tabela 7 está a relação dos meios de cultura empregados, indicando o número de bactérias que foram isoladas nesses meios, de acordo com a área (A1, A2 e A3) e a cultura (trigo e milho).

Tabela 7. Número de bactérias isoladas de trigo e milho na área 1, 2 e 3 nos diferentes meios de cultura empregados, Palotina/PR – 2011

	MEIOS DE CULTIVO							TOTAL
	DYGS	NFb	JNFb	LG	LGD	LGI	LGI-P	
TRIGO A1	2	2	3	1	4	3	2	17
MILHO A1	4	3	6	2	6	2	3	26
TOTAL A1	6	5	9	3	10	5	5	43
TRIGO A2	0	2	4	4	5	3	3	21
MILHO A2	5	2	7	2	4	4	4	28
TOTAL A2	5	4	11	6	9	7	7	49
TRIGO A3	0	2	2	3	3	3	4	17
MILHO A3	4	4	3	4	4	4	4	27
TOTAL A3	4	6	5	7	7	7	8	44
TOTAL TRIGO	2	6	9	8	12	9	9	55
TOTAL MILHO	13	9	16	8	14	10	11	81
TOTAL GERAL	15	15	25	16	26	19	20	136

A1: área 1 - Argissolo vermelho (Iporã/PR); A2: área 2 - Latossolo roxo (Linha La Salle-Palotina/PR) e A3: área 3 - Nitossolo vermelho (Linha Aparecidinha-Palotina/PR).

No total de isolados através dos meios de cultura empregados 11% foram isolados no meio DYGS; 11% no meio NFb, 18% no meio JNFb, 12% no meio LG, 19% no meio LGD, 14% no meio LGI e 15% no meio LGI-P (Tabela 7).

A área que teve maior número de isolados foi a A2 com 49 isolados ou 36% do total independente da cultura. Os tipos de solos não foram importantes na especificidade das bactérias, uma vez que o número médio de isolados em todos os solos foi de 45.

Uma grande diversidade de bactérias foi obtida devido à utilização de diversos meios de cultura, sendo que alguns meios são seletivos para determinados gêneros de bactérias. O meio LG é indicado para isolar *Azotobacter* spp. e *Azomonas* spp., tem pH 7.0 e cor azul. O meio NFb é seletivo para *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans*, com pH de 6.5 ou 6.8, no entanto *Azospirillum amazonense* cresce em meio LGI, que tem um pH de 6.0 a 6.2. Para isolamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* utiliza-se o meio LGI-P, que tem pH 5.5. Para o isolamento de *Herbaspirillum* spp. é indicado o meio JNFb. O meio LGD com pH 7.0 é indicado para o isolamento de *Derxia* spp. (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

O meio de cultura DYGS é considerado um meio rico para favorecer o crescimento de bactérias em menor tempo de incubação (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999). Devido à esta característica, quando este meio foi utilizado, houve predominância de fungos e um número maior de população bacteriana, não sendo possível isolar estirpes nas áreas 2 e 3 em plantas de trigo. Porém, Gomes (2009) isolou bactérias de milho, utilizando meio DYGS, obtendo uma maior diversidade bacteriana endofítica de região de mata.

Com o meio DYGS foi possível isolar bactérias pela variação de pH na área 1. *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* foram caracterizadas em pH 6.0 (pH utilizado neste trabalho) e *Azospirillum* em pH 6.8 (KUSS et al., 2007). Porém para estas estirpes os meios de cultura NFB e JNFB foram desenvolvidos para o cultivo de isolados bacterianos diazotróficos de diferentes culturas e têm sido usados no isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, respectivamente. Especificamente *Azospirillum brasilense* cresce em meio JNFB-lactato (MACHADO et al., 1995) e para *Herbaspirillum* spp. é indicado o meio JNFB malato (KLASSEN et al., 1997).

De acordo com a tabela 6, todos os isolados bacterianos cresceram entre 28 a 30°C, com exceção do meio LGI (35 a 37°C). Quanto à forma, 49 bactérias foram classificadas como bacilos, 1 estreptococos, 2 diplococos e as demais cocos (84). As colorações verificadas nas colônias foram: incolor (66 bactérias), branca (41 bactérias), creme (1 bactéria) e amarela (28 bactérias). Dentre os isolados apenas 12 estirpes (9%) são Gram positivas: UFPRPALT 1-7, UFPRPALT 2-19, UFPRPALT 2-31, UFPRPALT 3-50, UFPRPALM 2-61, UFPRPALM 3-65, UFPRPALM 2-93, UFPRPALM 3-103, UFPRPALM 1-114, UFPRPALM 1-126, UFPRPALM 1-128 e UFPRPALM 1-133.

A maior parte das bactérias isoladas (91%) foi caracterizada como Gram negativa. A proporção obtida foi similar aos resultados relatado por Magnani (2005), no isolamento de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar. Na literatura, foram descritos diversos gêneros de bactérias diazotróficas como Gram negativas. Pode-se citar os gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* (MARIN et al., 1999) e *Azospirillum* (CARDOSO et al., 2010), *Pseudomonas* (FERNANDES et al., 2001), *Burkholderia* (MOREIRA e CORREIA, 2005).

Porém, existem bactérias diazotróficas Gram positivas, como a *Paenobacillus azotofixans* que é geneticamente diversa, podendo ser encontrada na rizosfera de

gramíneas, como trigo e cana-de-açúcar (BALDANI; BALDANI, 2005), e outras espécies de *Bacillus*.

As informações adquiridas pela caracterização morfológica são muito importantes no processo de seleção de estirpes eficientes, principalmente quando agregadas as características bioquímicas e genéticas, pois constituem etapa inicial para a identificação e posterior aplicação desses isolados em campo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Nas tabelas 8 a 10 estão apresentados os resultados das análises bioquímicas do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da concentração de AIA / proteína (sem adição de triptofano e com adição de triptofano), por área de isolamento. Os isolados foram divergentes quanto as suas capacidades em solubilizar fosfato e produzir AIA. Para a solubilização de fosfato, independente da área e cultura, 69 isolados, ou seja, 51% do total não apresentaram capacidade solubilizadora de fosfato, 14% apresentaram baixo índice de solubilização ($IS < 2$), 9,5% médio ($IS < 4$) e 25,5% alto ($IS \geq 4$), com elevado potencial para o desenvolvimento de biofertilizante.

Os valores de AIA variaram entre 19,94 μg de AIA mg^{-1} de proteína (UFPRPALM1-134) a 1170,98 μg de AIA mg^{-1} de proteína (UFPRPALM 2-32), sem a adição de triptofano, uma variação de 58 vezes na capacidade de produção de AIA. Nesta mesma análise, porém com adição de triptofano, apenas 42 isolados (31%) foram capazes de produzir AIA e os níveis observados foram maiores, variando de 362,18 (UFPRPALM 3-65) a 5599,57 (UFPRPALM 3-80) μg de AIA mg^{-1} de proteína, uma variação na ordem de 15 vezes. Dentre todos os isolados, apenas 6 estirpes, obtidas a partir de plantas iscas de milho, não foram capazes de sintetizar AIA.

Os controles bacterianos usados neste experimento foram *H. seropedicae* e *A. brasilense* que não apresentaram capacidade solubilizadora de fosfato. Arruda et al. (2013) também relataram ausência de solubilização de fosfato por estas duas espécies. Os controles conhecidos *H. seropedicae* e *A. brasilense* tiveram produção de AIA sem adição de triptofano de 135,76 e 90,08 μg de AIA mg^{-1} de proteína, respectivamente. Porém, com a presença do triptofano somente *H. seropedicae* foi capaz de sintetizar AIA (665,57 μg de AIA mg^{-1} de proteína).

Pedraza et al. (2004) verificaram níveis de 16,56 e 22,45 μg de AIA mg^{-1} de proteína para as estirpes Sp7 e Sp245 de *Azospirillum brasilense*. Fernandes (2012) observou valores para isolados bacterianos em citros com diferentes habilidades entre 1,36 e 264,4 μg de AIA mg^{-1} de proteína, que embora não tenham sido sequenciados e classificados taxonomicamente, demonstram uma grande variação. Na literatura, são descritas a capacidade produtora de AIA de 80,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA para *H. seropedicae* e 36,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA para *A. brasilense* (ARRUDA et al., 2013), embora sem possibilidade de comparação pelas unidades, os resultados obtidos neste experimento concordam com esta tendência de *H. seropedicae* ser mais eficiente na síntese de AIA.

Ao compararmos os resultados obtidos para muitos dos isolados, pode-se concluir que dentre os isolados há estirpes promissoras, ou seja, de alta performance na indução de crescimento vegetal (Tabelas 8 a 10) com valores superiores aos observados nos controles (estirpes já usadas comercialmente).

Na tabela 8 estão apresentados os resultados referentes a área 1 (Argissolo), quanto a ISF e a produção de AIA, tendo como planta isca o trigo. Apenas o isolado UFPRPALT 1-14 apresentou capacidade de solubilização de fosfato média, enquanto no milho, 11 isolados apresentaram capacidade alta de solubilização de fosfato e 8 isolados baixa capacidade. Os isolados UFPRPALM 1-121, UFPRPALM1-124; UFPRPALM 1-129 e UFPRPALM 1-131 formaram o grupo das estirpes com os maiores índices de ISF. Nesta mesma área, os resultados obtidos para a produção de AIA, agrupados pelo Scott-Knott ($p < 5\%$), apontam grupos distintos quanto à produção de AIA: o isolado UFPRPALM 1-131 (866,24 μg de AIA mg^{-1} de proteína) apresentou os maiores valores sem triptofano no meio de cultura e com a adição de triptofano, destacaram-se os isolados UFPRPALT 1-14 e UFPRPALM 1-122, com 2607,70 e 2397,02 μg de AIA mg^{-1} de proteína, respectivamente.

Tabela 8. Caracterização bioquímica através do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da concentração de ácido indol-3-acético (AIA) das estirpes bacterianas isoladas na área 1 (Argissolo vermelho) de raízes de trigo e milho na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2012

ISOLADOS	Índice de Solubilização de Fosfato			Concentração de AIA / Proteína	
	f Halo (mm) / f Colônia (mm)			(µg mg ⁻¹)	
	Baixo (IS<2)	Médio (IS<4)	Alto (IS≥4)	Sem triptofano	Com triptofano
UFPRPALT 1-1	-	-	-	60,22 e	-
UFPRPALT 1-2	-	-	-	97,00 d	-
UFPRPALT 1-3	-	-	-	99,60 d	-
UFPRPALT 1-4	-	-	-	187,68 b	-
UFPRPALT 1-5	-	-	-	192,06 b	-
UFPRPALT 1-6	-	-	-	59,97 e	-
UFPRPALT 1-7	-	-	-	116,28 d	-
UFPRPALT 1-8	-	-	-	82,43 d	168,29 e
UFPRPALT 1-9	-	-	-	65,96 e	-
UFPRPALT 1-10	-	-	-	106,10 d	-
UFPRPALT 1-11	-	-	-	193,90 b	-
UFPRPALT 1-12	-	-	-	54,44 e	-
UFPRPALT 1-13	-	-	-	72,56 e	-
UFPRPALT 1-14	-	3,13	-	81,65 d	2607,70 a
UFPRPALT 1-15	-	-	-	63,81 e	-
UFPRPALT 1-16	-	-	-	161,43 c	-
UFPRPALT 1-17	-	-	-	215,57 b	-
UFPRPALM 1-111	1,16 b	-	-	-	-
UFPRPALM 1-112	-	-	-	53,10 e	-
UFPRPALM 1-115	1,46 b	-	-	63,35 e	-
UFPRPALM 1-116	-	-	5,30 b	46,07 e	1914,64 b
UFPRPALM 1-117	-	-	5,27 b	98,91 d	1056,58 c
UFPRPALM 1-118	-	-	5,01 b	71,61 e	751,21 d
UFPRPALM 1-119	1,17 b	-	-	134,77 c	-
UFPRPALM 1-120	1,17 b	-	-	238,79 b	714,62 d
UFPRPALM 1-121	-	-	6,79 a	62,49 e	-
UFPRPALM 1-122	-	-	5,35 b	158,19 c	2397,02 a
UFPRPALM 1-123	1,96 a	-	-	-	-
UFPRPALM 1-124	-	-	6,25 a	57,34 e	947,04 c
UFPRPALM 1-125	-	-	5,93 a	-	-
UFPRPALM 1-126	-	-	5,57 b	-	-
UFPRPALM 1-127	1,32 b	-	-	82,11 d	387,77 e
UFPRPALM 1-128	1,19 b	-	-	164,94 c	-
UFPRPALM 1-129	-	-	6,27 a	87,68 d	-
UFPRPALM 1-130	1,18 b	-	-	179,69 b	1226,67 c
UFPRPALM 1-131	-	-	6,50 a	866,24 a	-
UFPRPALM 1-133	-	-	-	126,08 c	-
UFPRPALM 1-134	-	-	-	19,94 e	-
UFPRPALM 1-135	-	-	-	30,81 e	764,83 d
UFPRPALM 1-136	-	-	4,22 b	-	-
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	-	-	-	135,76 c	665,57 d
<i>Azospirillum brasiliense</i>	-	-	-	90,08 d	-
CV%	12,71	-	16,50	23,89	19,56

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, à 5% de probabilidade, na área 1 isolados da cultura do trigo e milho.

Na área 2 (Latossolo vermelho), conforme apresentado da tabela 9, referente aos isolados em trigo, foram observados apenas 4 isolados com médio ISF, sendo que o isolado UFPRPALT 2-30 forma um grupo distinto aos demais. No milho, bactérias solubilizadoras foram encontradas em maior número e com os três níveis de solubilização de fosfato (baixo, médio e alto). Os isolados UFPRPALM 2-89 e UFPRPALM 2-95 apresentaram-se como os de maior capacidade solubilizadora (índice médio de 7). Nos níveis médio e baixo para capacidade solubilizadora foram encontrados 2 grupos distintos, com índices variando de 2,10 a 3,53 (ISF<4) e 1,24 a 1,75 (ISF<2).

Na análise de produção de AIA, entre todos os isolados coletados na área 2, o isolado UFPRPALT 2-32 formou grupo distinto e superior aos demais em relação ao AIA sem adição do aminoácido precursor (Triptofano) (1170,98 μg de AIA mg^{-1} de proteína). Porém, com adição do triptofano, este isolado não foi capaz de síntese da auxina. O isolado UFPRPALT 2-33 obteve os maiores valores para a produção de AIA quando o triptofano foi adicionado ao meio (3556,17 μg de AIA mg^{-1} de proteína).

Tabela 9. Caracterização bioquímica através do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da concentração de ácido indol-3-acético (AIA) das estirpes bacterianas isoladas na área 2 (Latossolo roxo) de raízes de trigo e milho na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2012

ISOLADOS	Índice de Solubilização de Fosfato f Halo (mm) / f Colônia (mm)			Concentração de AIA / Proteína ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	
	Baixo (IS<2)	Médio (IS<4)	Alto (IS≥4)	Sem triptofano	Com triptofano
UFPRPALT 2-18	-	2,80 b	-	81,28 d	-
UFPRPALT 2-20	-	-	-	308,06 c	-
UFPRPALT 2-21	-	-	-	292,42 c	-
UFPRPALT 2-22	-	-	-	100,66 d	625,76 e
UFPRPALT 2-23	-	-	-	446,54 b	-
UFPRPALT 2-24	-	2,15 c	-	370,98 b	3054,10 b
UFPRPALT 2-25	-	-	-	285,51 c	1634,50 c
UFPRPALT 2-26	-	-	-	268,97 c	-
UFPRPALT 2-27	-	-	-	94,52 d	-
UFPRPALT 2-28	-	2,91 b	-	73,81 d	-
UFPRPALT 2-29	-	-	-	141,57 d	1648,84 c
UFPRPALT 2-30	-	3,67 a	-	159,95 d	1013,89 d
UFPRPALT 2-31	-	-	-	61,14 d	-
UFPRPALT 2-32	-	-	-	1170,98 a	-
UFPRPALT 2-33	-	-	-	309,29 c	3556,17 a
UFPRPALT 2-34	-	-	-	74,44 d	-
UFPRPALT 2-35	-	-	-	107,75 d	-
UFPRPALT 2-36	-	-	-	234,54 c	-
UFPRPALT 2-37	-	-	-	100,13 d	-
UFPRPALT 2-38	-	-	-	122,32 d	282,07 e
UFPRPALM 2-60	-	-	-	133,38 d	1281,84 d
UFPRPALM 2-61	-	-	-	146,76 d	-
UFPRPALM 2-62	-	-	-	74,45 d	-
UFPRPALM 2-63	-	3,53 a	-	106,73 d	-
UFPRPALM 2-68	-	2,10 c	-	70,08 d	-
UFPRPALM 2-69	-	-	-	86,14 d	-
UFPRPALM 2-74	1,31 b	-	-	236,31 c	-
UFPRPALM 2-75	-	-	-	50,82 d	572,28 e
UFPRPALM 2-76	-	-	-	422,06 b	-
UFPRPALM 2-77	-	-	-	180,38 d	897,42 e
UFPRPALM 2-85	1,75 a	-	-	151,24 d	-
UFPRPALM 2-89	-	-	7,51 a	152,76 d	2572,50 b
UFPRPALM 2-90	1,28 b	-	-	111,41 d	-
UFPRPALM 2-91	-	3,05 b	-	69,13 d	426,78 e
UFPRPALM 2-92	-	3,96 a	-	73,84 d	-
UFPRPALM 2-93	-	3,32 a	-	97,05 d	-
UFPRPALM 2-94	1,24 b	-	-	87,63 d	-
UFPRPALM 2-95	-	-	6,61 a	223,68 c	-
UFPRPALM 2-96	1,43 b	-	-	-	-
UFPRPALM 2-97	-	-	-	109,51 d	2830,41 b
UFPRPALM 2-106	-	-	-	80,06 d	-
UFPRPALM 2-107	-	-	-	117,25 d	1084,44 d
UFPRPALM 2-109	-	-	-	64,92 d	-
UFPRPALM 2-110	-	-	-	155,85 d	-
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	-	-	-	135,76 d	665,57 e
<i>Azospirillum brasiliense</i>	-	-	-	90,08 d	-
CV%	10,93	12,85	7,85	37,87	18,90

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, à 5% de probabilidade, na área 2 isolados da cultura do trigo e milho.

Ao analisar a caracterização bioquímica dos isolados coletados na área 3 foram observadas diferenças entre os isolados quanto à solubilização de fosfato e produção de AIA. Na tabela 10 estão apresentados os resultados da caracterização bioquímica dos isolados obtidos de raízes de trigo e milho na área 3 (Nitossolo vermelho). Para a variável ISF e, tendo como plantas isca o trigo, somente dois isolados foram capazes de solubilizar fosfato com IS médio e alto (UFPRPALT 3-48 e UFPRPALT 3-54, respectivamente).

Os isolados em plantas de milho puderam ser classificados nos três níveis. Destacaram-se os isolados UFPRPALM 3-70 e 3-78 (ISF<2); UFPRPALM 3-65 e 3-102 (ISF<4) e UFPRPALM 3-66 e 3-103 (ISF>4) formando grupos distintos e de maiores índices de solubilização de fosfato. Em relação a capacidade de síntese de AIA, todos os isolados foram capazes de sintetizar AIA em meio triptofano, com exceção do isolado UFPRPALT 3-48 (Tabela 10). O isolado UFPRPALM 3-73 com 449,16 μg de AIA mg^{-1} de proteína constituiu grupo distinto em relação aos demais em meio sem suplementação com triptofano e o isolado UFPRPALM 3-80 (5599,57 μg de AIA mg^{-1} de proteína) em meio com suplementação. Este último obteve o maior valor de concentração AIA por proteínas entre todos os isolados avaliados nos três tipos de solos e plantas iscas.

Tabela 10. Caracterização bioquímica através do índice de solubilização de fosfato (ISF) e da concentração de ácido indol-3-acético (AIA) das estirpes bacterianas isoladas na área 3 (Nitossolo vermelho) de raízes de trigo e milho na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2012

ISOLADOS	Índice de Solubilização de Fosfato f Halo (mm) / f Colônia (mm)			Concentração de AIA / Proteína ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	
	Baixo (IS<2)	Médio (IS<4)	Alto (IS≥4)	Sem triptofano	Com triptofano
UFPRPALT 3-39	-	-	-	293,04 d	-
UFPRPALT 3-41	-	-	-	92,93 g	-
UFPRPALT 3-42	-	-	-	51,21 h	-
UFPRPALT 3-45	-	-	-	382,67 b	3023,62 d
UFPRPALT 3-46	-	-	-	84,83 g	-
UFPRPALT 3-47	-	-	-	84,66 g	4698,89 b
UFPRPALT 3-48	-	2,87 a	-	-	-
UFPRPALT 3-51	-	-	-	115,89 f	-
UFPRPALT 3-52	-	-	-	65,57 h	904,56 h
UFPRPALT 3-53	-	-	-	160,78 f	2700,75 e
UFPRPALT 3-54	-	-	5,61 b	220,94 e	2050,48 f
UFPRPALT 3-55	-	-	-	88,06 g	-
UFPRPALM 3-56	1,31 b	-	-	80,22 g	498,70 i
UFPRPALM 3-57	-	-	-	64,59 h	-
UFPRPALM 3-58	1,27 b	-	-	153,10 f	-
UFPRPALM 3-59	-	-	-	73,80 g	-
UFPRPALM 3-64	1,38 b	-	-	57,21 h	816,02 h
UFPRPALM 3-65	-	3,13 a	-	54,68 h	362,18 i
UFPRPALM 3-66	-	-	7,66 a	133,45 f	3723,81 c
UFPRPALM 3-70	1,62 a	-	-	49,95 h	-
UFPRPALM 3-71	-	-	-	87,16 g	-
UFPRPALM 3-72	1,39 b	-	-	234,21 e	-
UFPRPALM 3-73	-	-	-	449,16 a	1421,70 g
UFPRPALM 3-78	1,58 a	-	-	78,50 g	522,19 i
UFPRPALM 3-80	-	-	-	46,67 h	5599,57 a
UFPRPALM 3-86	-	2,02 b	-	99,10 g	1180,37 g
UFPRPALM 3-87	-	-	4,49 b	340,93 c	477,86 i
UFPRPALM 3-88	-	-	-	79,62 g	-
UFPRPALM 3-98	-	-	-	106,42 g	-
UFPRPALM 3-100	-	-	-	231,21 e	-
UFPRPALM 3-101	-	-	-	166,70 f	-
UFPRPALM 3-102	-	2,88 a	-	24,10 h	-
UFPRPALM 3-103	-	-	6,99 a	88,24 g	-
UFPRPALM 3-104	-	-	-	92,03 g	-
UFPRPALM 3-105	-	-	-	85,81 g	-
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	-	-	-	135,76 f	665,57 h
<i>Azospirillum brasiliense</i>	-	-	-	90,08 g	-
CV%	11,64	21,04	15,72	17,60	8,80

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, à 5% de probabilidade, na área 3 isolados da cultura do trigo e milho.

As bactérias podem diferir quanto a habilidade de solubilizar fosfato. Sachdev et al. (2010) observaram que bactérias do gênero *Acinetobacter* isolados da mesma cultivar de trigo (HI1535), demonstraram diferentes habilidades em solubilizar P em meio líquido sendo que estas apresentaram valores variando de 80 a 362 ppm de P.

Diante dos resultados obtidos, verifica-se uma grande variação entre os isolados. Aqueles que apresentaram maior ISF ($IS \geq 4$) seriam os de maior habilidade na alteração do pH, na produção de ácidos orgânicos e na mineralização pelas fosfatases e fitases (AHMED et al., 2008).

Richardson et al. (2009) citam que a produção de ácidos orgânicos é dependente de fontes de C disponíveis na rizosfera e pode estar regulada por repressão catabólica de ácidos orgânicos como malato e succinato em *Pseudomonas sp.* Deste modo, a presença de um número maior de bactérias solubilizadoras na rizosfera do milho seria proporcional aos exsudatos que esta espécie produz. Pedrinho et al. (2010) ao avaliarem isolados bacterianos da rizosfera do milho verificaram uma variação na capacidade de solubilizar fosfato com predomínio dos gêneros *Burkholderia* e *Bacillus*. Neste experimento, também houve um predomínio dos gêneros *Burkholderia* e *Bacillus* e também *Agrobacterium*. El-Komy (2005) observaram que *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus megaterium* foram efetivas na solubilização de P dos solos. Dados obtidos por Inui (2009) confirmam que isolados do gênero *Burkholderia* constituíram um dos principais grupos quanto à solubilização de fosfato isolados em cana-de-açúcar. Também, observaram que isolado A5I42 (Rhizobiaceae) apresentou atividade solubilizadora de fosfato.

Entre os 136 isolados 12,5% apresentaram alta capacidade de solubilização fosfato e 82,35% de sintetizar AIA em meio sem triptofano. Aqueles isolados que não apresentaram esta característica poderiam ser considerados neutros. A produção de AIA pelas bactérias aumentaria o tamanho do sistema radicular, permitindo que uma maior área de solo seja explorada em termos de nutrientes e de água pela planta, indicando estirpes promissoras para serem usadas como biofertilizantes.

O AIA pode ser sintetizado por via dependente e independente de Triptofano. Nas bactérias fitopatogênicas, tais como *Agrobacterium tumefaciens* e biovars de *Pseudomonas syringae*, o AIA é produzido pela via do intermediário indol-3-acetamida (IAM) e tem sido relacionado à formação de tumores em plantas.

As bactérias benéficas sintetizam AIA predominantemente através do ácido indol-3-pirúvico (AIP). Esta capacidade de síntese pelas bactérias dependerá da composição dos exsudatos das plantas, porque o triptofano é precursor do AIA e age na molécula sinal pela indução dos genes *ipdC/ppdC* (RYU e PATTEN, 2008). Entretanto, nos testes várias estirpes produziram AIA na ausência do Triptofano e não na presença.

Loper et al. (2012) ao compararem 10 diferentes cepas de *Pseudomonas*, relatam que somente 2 delas foram capazes de produzir AIA pela via indol-3-acetamida (IAM). Farina et al. (2012) citam diferentes habilidades de isolados quanto a produção de AIA. Os isolados puderam variar entre diferentes gêneros, sendo *Agrobacterium*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* os que apresentaram os maiores índices e, dentro do mesmo gênero *Burkholderia*, 4 isolados foram incapazes de produzir AIA.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.3.1 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado

Dos 136 isolados, apenas 84 foram levados para a caracterização molecular. Isto ocorreu pelo fato da não sobrevivência de alguns isolados após um período de preservação, o que indica a dependência destes microrganismos de compostos possivelmente fornecidos através da suspensão do macerado vegetal. Além disso, apontam para a presença de um grande percentual de bactérias fastidiosas, cujas necessidades nutricionais são desconhecidas e com impossibilidade de cultivo *in vitro* por práticas laboratoriais de rotina (STOLTZFUS et al., 1997; ELBELTAGY et al., 2001). Dey, Pal e Tilak (2012) relatam que apenas 1% da população microbiana pode ser cultivada *in vitro*.

O DNA genômico de 84 isolados bacterianos foi extraído e submetido a reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) para amplificação de seus genes 16S rDNA. Essa reação foi realizada com os pares de oligonucleotídeos Y1-Y3. O produto da reação de amplificação com os oligonucleotídeos Y1-Y3 corresponde ao gene 16S rDNA quase completo.

A análise dos produtos de amplificação obtidos confirmou a obtenção de fragmento com tamanho esperado, cerca de 1500pb (Figura 6). Magnani (2005) e Reis Jr, Teixeira e Reis (2004) também relataram o mesmo padrão de bandas em isolados bacterianos.

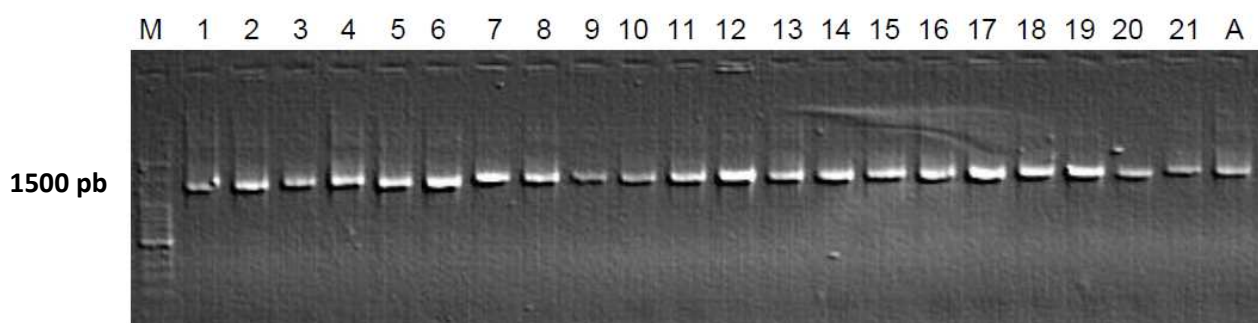


Figura 6. Análises de PCR do gene 16S rDNA de isolados bacterianos escolhidos aleatoriamente. Linha M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Linhas 1 a 21 – isolados bacterianos; Linha A – *Azospirillum brasilense* Ab-V5.

FONTE: a autora (2013).

Os fragmentos amplificados foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: *Hae* III, *Hinf* I e *Rsa* I. A enzima *Hinf* I produziu maior número de bandas polimórficas (11), seguida pela enzima *Rsa* I com 8 bandas e *Hae* III com 7 bandas. O tamanho das bandas foi de 100 a 1100 pb. Como resultados obtidos, os perfis de restrição apresentaram grande variabilidade (Figura 7).

O dendograma construído a partir da matriz de dissimilaridade genética, calculada pela análise do perfil de fragmentos de restrição da região 16S rDNA, agrupou os isolados em 8 grupos distintos com 70% de dissimilaridade, ou seja 30% de similaridade genética suficiente para a discriminação de diferentes grupos de isolados. O grupo 1 consistiu de três isolados, os grupos 2 e 6 foram formados por dois isolados cada. O grupo 3 por oito isolados, o grupo 5 de cinco isolados e os grupos 7 e 8 por apenas um isolado cada. O grupo 4 consistiu de 63 isolados dividido em 2 sub grupos: 4A com 17 isolados e o 4B formado por 46 isolados. Apenas oito isolados (dois isolados do grupo 1 e seis no 4B) apresentaram semelhanças genéticas clonais.

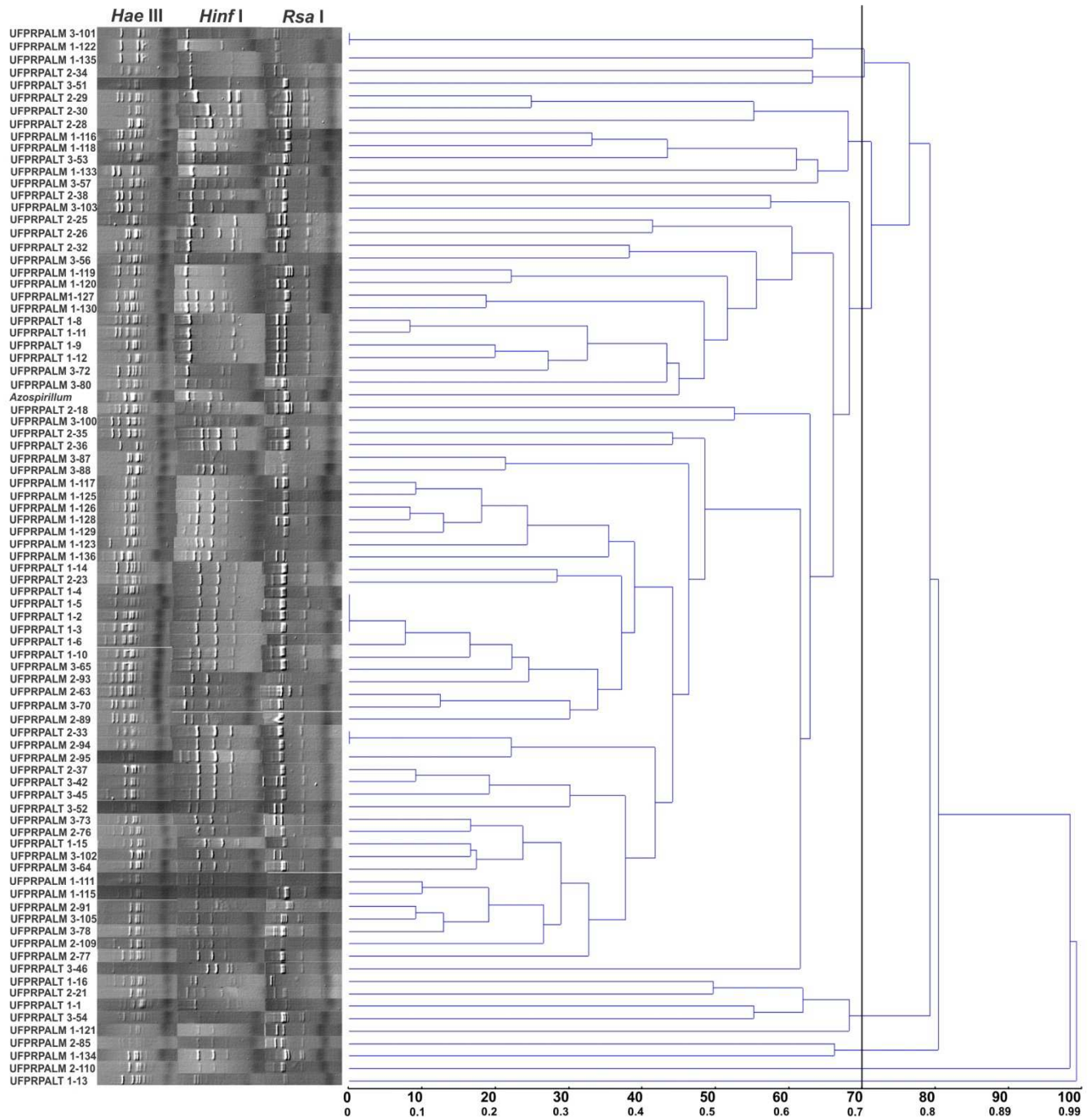


Figura 7. Dendrograma gerado a partir de ARDRA, obtido por digestão independente do produto amplificado do gene rDNA 16S com as enzimas *Hae* III, *Hinf* I e *Rsa* I, em gel de agarose ilustrando a relação (% dissimilaridade) entre os isolados de plantas trigo e milho, nas três áreas de coleta.

FONTE: a autora (2013).

Os ácidos nucleicos ribossomais (rRNA) são considerados biopolímeros adequados para estudos de diversidade. Seus genes, o rDNA, são universalmente distribuídos, sendo a molécula com maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode se apresentar em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (LANE et al.,1985).

Diversos autores utilizaram a técnica do ARDRA para avaliar a diversidade genética de isolados de plantas iscas (MENGONI et al., 2003; TEIXEIRA; MELO e VIEIRA, 2005; TORRES, 2005; SUN et al., 2008). Reis Jr, Teixeira e Reis (2004) analisaram por meio de ARDRA, o efeito do genótipo da planta e do sítio de coleta na diversidade intra-específica de isolados de *Azospirillum amazonense*, oriundos de associações com raízes de *Brachiaria*. Ruiz et al. (2000) utilizaram o ARDRA para identificação de espécies de acetobactérias. Alguns autores tem ainda estudado a diversidade genética de isolados de solo ou planta iscas, empregando enzimas de restrição em produto da amplificação do gene *NifH* (BENEDUZI et al., 2008a; BENEDUZI et al., 2008b; VENIERAKI et al., 2011; BENEDUZI et al., 2013).

Analisando a figura 7, pode-se perceber que os grupos 1, 6 e 7 consistiram de isolados de plantas iscas de milho de diferentes locais de coleta. O grupo 8 consistiu de isolados unicamente obtidos a partir do trigo, da área 1. Por outro lado, os demais grupos consistiram de isolados de ambas as plantas iscas e locais de coleta.

Apesar de vários autores citarem que o tipo de solo tem influência sobre a determinação da comunidade dominante bacteriana (BASHAN et al., 1995; GERMIDA et al., 1998), não houve uma clara distinção sobre o efeito do local de coleta e a microbiota existente. Os dados obtidos também discordam de Reis Jr, Teixeira e Reis (2004) que relataram uma influência do tipo de solo na variabilidade dos isolados e que poderia ser atribuída às diferentes características ambientais (químicas, físicas e biológicas), principalmente a textura e umidade dos solos como fator predominante na diversidade de espécies de *Azospirillum amazonense*. Latour et al. (1996) observaram intensa influência exercida pelo tipo de solo na estrutura populacional de isolados de *Pseudomonas*, sugerindo que as diferentes características ambientais existentes poderiam ser responsáveis pelo efeito discriminatório.

Dey, Pal e Tilak (2012) citam que o tipo de solo é o maior determinante na estrutura das comunidades microbiana. Características como textura e estrutura, teores de matéria orgânica, estabilidade de microagregados, pH e presença de nutrientes essenciais como: N, P e Fe determinam os nichos microbianos. Além disso, outros fatores como manejo dos solos, rotação de culturas, uso de herbicidas, fertilizantes e irrigação devem ser levados em conta também.

Em solos argilosos, com textura mais fina, haveria maior retenção de água e capacidade de troca catiônica (CTC) resultando em maiores teores de nutrientes e por isso maior comunidade microbiana (INUI, 2009; HUESO; GARCÍA e HERNÁNDEZ, 2012). O efeito ocorreria também, pela rizosfera radicular, onde os exsudatos: açúcares e aminoácidos seriam adsorvidos e ficariam ligados as partículas de argila e estariam menos disponíveis para as bactérias (KUSKE et al., 2002). Hoper et al. (1995) observaram que solos de pH neutro (7) e argilosos aumentaram a densidade da comunidade de *Pseudomonas fluorescentes*.

Vaidya et al., (2008) afirmam que solos com alto teor de matéria orgânica (MO) apresentam maior microbiota por terem disponíveis maior fonte de C, P e N e estas fontes aumentam a nutrição e crescimento vegetal, permitindo uma alta população epi e endofítica. Os diferentes teores de matéria orgânica (MO) observados nos 3 diferentes solos não foram suficientes para modificar a microbiota, pois o Argissolo vermelho (área 1), mais arenoso e de menor teor de MO (%) apresentou maior diversidade de espécies dentre as sequenciadas, com 21 exemplares diferentes.

Os resultados obtidos mostraram não haver aparente correlação entre grupo genotípico e produção de AIA ou solubilização de fosfato (Tabelas 8 a 10) indicando que estes mecanismos estão presentes em determinadas bactérias independente do perfil dos elementos ARDRA. Isto corrobora com informações postuladas que muitas bactérias diazotróficas são ubíquas, desempenhando além da FBN a solubilização de fosfatos insolúveis e produção de AIA, que são mecanismos amplamente distribuídos entre os microrganismos rizosféricos (KHAN et al., 2009; ZAIDI et al., 2009).

4.3.2 Análise das Sequências do Gene 16S rDNA

O produto da amplificação do gene 16S rDNA foi preparado para reação de sequenciamento e as sequências obtidas foram analisadas utilizando o programa *Seqmatch* que usa o banco de dados RDP (*Ribosomal Data Project* - www.rdp.cme.edu). Essa análise resultou na distribuição das sequências em oito grupos, onde todas as sequências dos isolados foram analisadas em conjunto e classificadas nesses grupos de acordo com a identidade de sequência (Tabela 11).

Os isolados dos grupos I a IV pertencem a divisão Proteobacteria dentro da classe Gammaproteobacteria. No grupo I estão os isolados da ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae, sendo estes: UFPRPALT 1-5, UFPRPALT 1-8, UFPRPALT 1-14 (gênero *Pantoea*), UFPRPALT 2-23, UFPRPALT 2-26, UFPRPALT 2-28, UFPRPALT 2-36, UFPRPALT 3-45, UFPRPALT 3-46 (gênero *Pantoea*), UFPRPALM 2-77, UFPRPALM 2-91, UFPRPALM 1-127.

O grupo II o isolado UFPRPALT 2-21 é o único representante da ordem Pseudomonadales, família Pseudomonaceae, gênero *Pseudomonas*. Já no grupo III, da mesma ordem, porém da família Moraxellaceae, gênero *Acinetobacter* estão os isolados UFPRPALT 2-37 e UFPRPALM 3-80. No grupo IV está o isolado da ordem Xanthomonadales, família Xanthomonadaceae, gênero *Stenotrophomonas* UFPRPALT 1-13.

A classe Alphaproteobacteria constitui o grupo V da ordem Rhizobiales, família Rhizobiaceae, gênero *Agrobacterium*, com maior número de isolados: UFPRPALT 1-1, UFPRPALT 1-2, UFPRPALT 1-3, UFPRPALT 1-4, UFPRPALT 1-6, UFPRPALT 1-11, UFPRPALT 1-16, UFPRPALT 2-32, UFPRPALT 3-51, UFPRPALM 3-56, UFPRPALM 3-72, UFPRPALM 1-119, UFPRPALM 1-120, UFPRPALM 1-121 e UFPRPALM 1-135. Ainda neste grupo V um isolado pertencente ao gênero *Ensifer*.

Outra classe dentro da divisão Proteobacteria é a classe Betaproteobacteria que compreende o grupo VI, da ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae, gênero *Burkholderia*, onde foram incluídos os isolados UFPRPALT 1-10, UFPRPALM 3-87, UFPRPALM 3-101, UFPRPALM 1-118 e UFPRPALM 1-122.

Os grupos VII e VIII pertencem à divisão Firmicutes, classe Bacilli, ordem Bacillales, sendo o grupo VI da família Bacillaceae, gênero *Bacillus*, com os isolados UFPRPALM 2-93, UFPRPALM 3-103 e UFPRPALM 1-128. E o grupo VIII da família Paenibacillaceae, gênero *Brevibacillus* o isolado UFPRPALM 1-133.

Tabela 11. Provável posição taxonômica de bactérias isoladas de raízes de trigo e milho em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2013

Domínio Bacteria		
Divisão Proteobacteria		
Classe Gammaproteobacteria		
Grupo I	Ordem Enterobacteriales	
	Família Enterobacteriaceae	
	UFPRPALT 1-5	UFPRPALT 2-36
	UFPRPALT 1-8	UFPRPALT 3-45
	UFPRPALT 1-14 (gênero <i>Pantoea</i>)	UFPRPALT 3-46 (gênero <i>Pantoea</i>)
	UFPRPALT 2-23	UFPRPALM 2-77
	UFPRPALT 2-26	UFPRPALM 2-91
	UFPRPALT 2-28	UFPRPALM 1-127
Grupo II	Ordem Pseudomonadales	
	Família Pseudomonaceae	
	Gênero <i>Pseudomonas</i>	
	UFPRPALT 2-21	
Grupo III	Família Moraxellaceae	
	Gênero <i>Acinetobacter</i>	
	UFPRPALT 2-37	UFPRPALM 3-80
Grupo IV	Ordem Xanthomonadales	
	Família Xanthomonadaceae	
	Gênero <i>Stenotrophomonas</i>	
	UFPRPALT 1-13	
Classe Alphaproteobacteria		
Grupo V	Ordem Rhizobiales	
	Família Rhizobiaceae	
	Gênero <i>Agrobacterium</i>	
	UFPRPALT 1-1	UFPRPALM 3-56
	UFPRPALT 1-2	UFPRPALM 3-72
	UFPRPALT 1-3	UFPRPALM 2-95
	UFPRPALT 1-4	UFPRPALM 1-119
	UFPRPALT 1-6	UFPRPALM 1-120
	UFPRPALT 1-11	UFPRPALM 1-121
	UFPRPALT 1-16	UFPRPALM 1-135
	UFPRPALT 3-51	
	Gênero <i>Ensifer</i>	
UFPRPALT 2-32		
Classe Betaproteobacteria		
Grupo VI	Ordem Burkholderiales	
	Família Burkholderiaceae	
	Gênero <i>Burkholderia</i>	
	UFPRPALT 1-10	UFPRPALM 1 -118
	UFPRPALM 3-87	UFPRPALM 1 -122
	UFPRPALM 3-101	
Divisão Firmicutes		
Classe Bacilli		
Grupo VII	Ordem Bacillales	
	Família Bacillaceae	
	Gênero <i>Bacillus</i>	
	UFPRPALM 2-93	
	UFPRPALM 3-103	
	UFPRPALM 1-128	
Grupo VIII	Família Paenibacillaceae	
	Gênero <i>Brevibacillus</i>	
	UFPRPALM 1-133	

As sequências parciais dos genes 16S rDNA de estirpes endofíticas isoladas de plantas de trigo e milho foram analisadas utilizando o programa *Seqmatch* (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

As sequências também foram comparadas com sequências do banco de dados público GenBank através do programa BLASTn (NCBI-www.ncbi.nih.gov). Os resultados dessa comparação estão apresentados na tabela 12. Essa análise apresentou valores de *score* variando entre 867 e 1958, sendo o isolado UFPRPALT 2-23 o que apresentou o menor valor (867) e o isolado UFPRPALT 1-3 o maior valor (1958). Os resultados obtidos reproduziram os níveis hierárquicos da análise anterior onde a maioria das sequências foi reunida em dois principais grupos, um junto à família Enterobacteriaceae e outro com a família Rhizobiaceae. Nessa análise, o isolado UFPRPALM 1-122 foi classificado como uma bactéria *Burkholderia* sp., os demais foram classificados com o epíteto específico.

Furnkranz, Muller e Berg (2009) relataram que bactérias do gênero *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pectobacterium*, *Ochrobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pantoea* e *Burkholderia* sp. foram isoladas a partir de girassol e sorgo. Beneduzi et al. (2008b) ao isolaram bactérias de 7 diferentes regiões produtoras de trigo no Rio Grande do Sul, obtiveram 311 isolados, classificados em 40 grupos distintos, onde o gênero mais comum foi *Pseudomonas*. Farina et al. (2012) isolaram bactérias endofíticas a partir de canola e verificaram grande biodiversidade entre os isolados. Em 7 diferentes locais, os autores obtiveram 27 diferentes gêneros bacterianos onde os gêneros mais comuns foram *Agrobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Enterobacteria*. Todos estes trabalhos demonstram a grande biodiversidade de gêneros existente nos solos e plantas iscas estudadas, onde o tipo e número da comunidade microbiana naturalmente residente de determinado solo dependerá de vários fatores físicos, químicos e biológicos e da interação entre estes.

Todas as cepas isoladas foram avaliadas quantos aos perfis morfológico e bioquímico, porém apenas 41 do total de isolados neste trabalho foram sequenciadas. Destas, 22 foram isoladas do trigo e 19 do milho.

Tabela 12. Identificação preliminar com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rDNA, das bactérias isoladas de raízes de trigo e milho em três áreas de mata na Região Oeste do Paraná, Palotina/PR – 2013

Isolados	Organismo mais relacionado	Score	Valor E	Identidade	Tamanho fragmento	Acesso no Genbank
UFPRPALT 1-1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1803	0.0	97%	1213	NR_041396.1
UFPRPALT 1-2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1810	0.0	93%	1206	NR_041396.1
UFPRPALT 1-3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1958	0.0	98%	1168	NR_041396.1
UFPRPALT 1-4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1954	0.0	98%	1171	NR_041396.1
UFPRPALT 1-5	<i>Shigella flexneri</i>	1572	0.0	97%	936	NR_026331.1
UFPRPALT 1-6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1932	0.0	97%	1173	NR_026331.1
UFPRPALT 1-8	<i>Shigella flexneri</i>	1371	0.0	93%	965	NR_026331.1
UFPRPALT 1-10	<i>Burkholderia unamae</i>	1825	0.0	96%	1189	NR_027569.1
UFPRPALT 1-11	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1871	0.0	97%	1167	NR_026331.1
UFPRPALT 1-13	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1411	0.0	95%	971	NR_028930.1
UFPRPALT 1-14	<i>Pantoea ananatis</i>	896	0.0	85%	934	NR_026045.1
UFPRPALT 1-16	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1445	0.0	95%	968	NR_026331.1
UFPRPALT 2-21	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1319	0.0	94%	1216	NR_044974.1
UFPRPALT 2-23	<i>Shigella sonnei</i>	867	0.0	94%	682	NR_074894.1
UFPRPALT 2-26	<i>Escherichia fergusonii</i>	1609	0.0	97%	950	NR_074902.1
UFPRPALT 2-28	<i>Shigella flexneri</i>	1550	0.0	97%	970	NR_026331.1
UFPRPALT 2-32	<i>Ensifer adhaerens</i>	1646	0.0	98%	977	NR_042482.1
UFPRPALT 2-36	<i>Escherichia fergusonii</i>	1555	0.0	98%	945	NR_074902.1
UFPRPALT 2-37	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1576	0.0	97%	952	NR_044975.1
UFPRPALT 3-45	<i>Escherichia fergusonii</i>	1659	0.0	98%	955	NR_074902.1
UFPRPALT 3-46	<i>Pantoea vagans</i>	1112	0.0	89%	970	NR_102966.1
UFPRPALT 3-51	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1513	0.0	93%	967	NR_026331.1
UFPRPALM 3-56	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	1358	0.0	94%	979	NR_074504.1
UFPRPALM 3-72	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	1565	0.0	98%	951	NR_074504.1
UFPRPALM 2-77	<i>Enterobacter asburiae</i>	1552	0.0	97%	961	NR_024640.1
UFPRPALM 3-80	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1567	0.0	98%	969	NR_044975.1
UFPRPALM 3-87	<i>Burkholderia ambifaria</i>	1576	0.0	97%	976	NR_074687.1
UFPRPALM 2-91	<i>Enterobacter asburiae</i>	1472	0.0	97%	921	NR_024640.1
UFPRPALM 2-93	<i>Bacillus safensis</i>	1611	0.0	97%	959	NR_041794.1
UFPRPALM 2-95	<i>Agrobacterium fabrum</i>	1376	0.0	97%	837	NR_074266.1
UFPRPALM 3-101	<i>Burkholderia unamae</i>	1459	0.0	94%	1050	NR_027569.1
UFPRPALM 3-103	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1652	0.0	98%	957	NR_043403.1
UFPRPALM 1-118	<i>Burkholderia cepacia</i>	1500	0.0	94%	1175	NR_041719.1
UFPRPALM 1-119	<i>Agrobacterium fabrum</i>	1134	0.0	90%	1019	NR_074266.1
UFPRPALM 1-120	<i>Agrobacterium fabrum</i>	928	0.0	97%	563	NR_074266.1
UFPRPALM 1-121	<i>Agrobacterium fabrum</i>	1129	0.0	93%	786	NR_074266.1
UFPRPALM 1-122	<i>Burkholderia</i> sp.	1138	0.0	90%	991	NR_102890.1
UFPRPALM 1-127	<i>Escherichia fergusonii</i>	1154	0.0	97%	970	NR_074902.1
UFPRPALM 1-128	<i>Bacillus megaterium</i>	1557	0.0	97%	1038	NR_074290.1
UFPRPALM 1-133	<i>Brevibacillus agri</i>	1622	0.0	97%	954	NR_040983.1
UFPRPALM 1-135	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	1546	0.0	96%	979	NR_026519.1

Análise baseada na identidade de sequências da região Y1-Y3 do gene 16S rDNA com sequências do banco de dados do Genbank. O programa utilizado foi o BLASTn. **Organismo mais relacionado:** organismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado bacteriano de raízes de trigo ou milho que apresentou maior homologia. **Score:** pontuação do alinhamento. **Valor E:** probabilidade de se encontrar aleatoriamente o mesmo alinhamento entre duas sequências. **Identidade:** porcentagem de identidade entre a sequência do isolado de trigo ou milho e o organismo relacionado. **Tamanho do fragmento:** tamanho da sequência. **Acesso no GenBank:** número de acesso da sequência do organismo relacionado.

Na tabela 13 estão os 41 isolados sequenciados, de acordo com a área e a planta isca em que foram isolados. Deste total, 8 são da espécie *Agrobacterium tumefaciens*, os quais foram isolados somente de plantas de trigo, na área 1 (7) e na área 3 (1). Outras espécies bacterianas foram isoladas somente em trigo, como *Shigella flexneri*, (2 na área 1 e 1 na área 2), *Stenotrophomonas rhizophila* (1) e *Pantoea ananatis* (1), isolados da área 1; *Shigella sonnei* (1), *Pseudomonas chlororaphis* (1) e *Ensifer adhaerens* (1), obtidos na área 2 e *Pantoea vagans* (1) na área 3.

Já as espécies *Agrobacterium radiobacter* (2), *Bacillus thuringiensis* (1) e *Burkholderia ambifaria* (1), foram isolados somente em plantas de milho na área 3, *Enterobacter asburiae* (2) e *Bacillus safensis* (1) isoladas na área 2 e *Agrobacterium larrymoorei*, *Brevibacillus agri*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia cepacia* e *Burkholderia* sp. todos com 1 representante foram isoladas da área 1. Ainda isolado do milho a bactéria *Agrobacterium fabrum*, com 3 representantes na área 1 e 1 na área 2.

Dos sequenciados nenhuma espécie foi encontrada nas duas culturas e em todas as áreas de coleta. A espécie *Escherichia fergusonii* foi a mais amplamente distribuída por ter sido encontrada em trigo nas áreas 2 (2) e 3 (1) e em milho na área 1 (1). *Acinetobacter johnsonii* foi isolado 1 representante na área 2 de plantas de trigo e 1 na área 3 de plantas de milho e *Burkholderia unamae* além de ter sido isolada na área 3 em milho, também foi isolada na área 1 em trigo, ambas com 1 representante dessa espécie.

Tabela 13. Número de espécies identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rDNA dos isolados de plantas de trigo e milho nas três áreas, Palotina 2013

Espécies / Gêneros Identificados	TRIGO			MILHO		
	A1	A2	A3	A1	A2	A3
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7	-	1	-	-	-
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	-	-	-	-	-	2
<i>Agrobacterium fabrum</i>	-	-	-	3	1	-
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	2	1	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i>	-	-	-	-	2	-
<i>Pantoea vagans</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Pantoea ananatis</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Ensifer adhaerens</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Brevibacillus agri</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Escherichia fergusonii</i>	-	2	1	1	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	-	1	-	-	-	1
<i>Bacillus safensis</i>	-	-	-	-	1	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	1
<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Burkholderia unamae</i>	1	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia ambifaria</i>	-	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	1	-	-
<i>Burkholderia</i> sp.	-	-	-	1	-	-
Total	12	7	3	9	4	6

A1: Área 1 (Argissolo vermelho – Iporã/PR); A2: Área 2 (Latossolo roxo – Linha La Salle-Palotina/PR) e A3: Área 3 (Nitossolo vermelho – Linha Aparecidinha-Palotina/PR).

Não foi possível observar influência da variedade sobre os agrupamentos uma vez que alguns gêneros puderam ser observados nos 3 tipos de solos e a totalidade das bactérias isoladas não puderam ser sequenciadas e ou caracterizadas não permitindo maiores conclusões para os solos em questão. Rodrigues et al. (2006) também observaram resultados similares na caracterização de *Burkholderia* e *Herbaspirillum* a partir de plantas de arroz inoculados em 2 tipos distintos de solo (argiloso e arenoso).

4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE TRIGO

Para verificar a capacidade associativa de alguns isolados com plantas de trigo, foi realizado o experimento de inoculação *in vitro*, contando com condições gnobióticas que apresenta como vantagem a exclusão da ação de outros fatores mimetizando a associação entre planta x bactéria. Para este estudo, foram escolhidos seis isolados (UFPRPALT 1-1; 1-14; UFPRPALM 2-77; UFPRPALM 3-87; UFPRPALM 1-121 e UFPRPALM 1-122), sendo que estes variaram em termos de produção de AIA, solubilização de fosfato e origem de isolamento: milho e trigo como planta isca. Os resultados obtidos no experimento são apresentados na tabela 14.

Foram observadas diferenças em relação à associação com plantas de trigo. O isolado UFPRPALM 3-87 (*Burkholderia ambifaria*) em associação com o trigo promoveu um aumento significativo no comprimento da raiz, massa fresca de parte aérea. Tais resultados poderiam ser explicados pela maior capacidade deste isolado em produzir AIA, o que corresponderia a maior comprimento da raiz e maior interação com as plantas, uma vez que o isolado obteve o maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) endofíticas ($1,36 \cdot 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$).

Por outro lado, o isolado UFPRPALM 1-122 (*Burkholderia* sp.) com capacidade de síntese de AIA demonstrou ter um efeito inibitório sobre o crescimento vegetal, promovendo redução no comprimento da raiz, altura das plantas, massa fresca da parte aérea e radicular e apresentou baixa capacidade associativa com o trigo ($0,08 \cdot 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$). Estes resultados evidenciam a compatibilidade do genótipo bacteriano para uma associação benéfica com a planta, e que independente da espécie vegetal em que foram isolados, os mesmos interagem com diferentes plantas, como ocorreu com o isolado UFPRPALM 3-87 que foi isolado em milho e apresentou a melhor performance *in vitro* em plântulas de trigo.

Tabela 14. Características morfofisiológicas avaliadas em plântulas de trigo *in vitro*, em função da inoculação com diferentes isolados de bactéria, e características bioquímicas dos isolados, Palotina/PR – 2012

ISOLADOS		Características morfofisiológicas das plântulas de trigo inoculadas									Características bioquímicas dos isolados		
		ALTURA (cm)	COMPR. RAIZ (cm)	MF AÉREA (mg)	MS AÉREA (mg)	MF RAIZ (mg)	MS RAIZ (mg)	N TOTAL (g Kg ⁻¹)	EPIFÍTICA (x10 ⁶ UFC mL ⁻¹)	ENDOFÍTICA (x10 ⁶ UFC mL ⁻¹)	ISF	[AIA]/ [PROTEÍNA] (µg mg ⁻¹) Trp-	[AIA]/ [PROTEÍNA] (µg mg ⁻¹) Trp+
UFPRPALT 1-1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16,43 a	12,50 b	43,18 c	6,01 b	70,00 ab	8,33 a	59,50 a	-	0,20	-	60,22 b	-
UFPRPALT 1-14	<i>Pantoea ananatis</i>	15,00 b	10,00 bc	22,96 d	2,68 c	27,00 c	6,33 ab	43,80 f	1,90	0,13	3,13 b	81,65 b	2607,70 a
UFPRPALM 2-77	<i>Enterobacter asburiae</i>	15,00 b	7,50 cde	39,78 c	6,61 b	25,33 c	4,66 ab	45,40 e	2,11	0,20	-	180,38 b	897,42 b
UFPRPALM 3-87	<i>Burkholderia ambifaria</i>	15,50 b	15,50 a	67,01 a	21,5 a	63,00 ab	8,00 ab	45,30 e	0,31	1,36	4,49 ab	340,93 a	477,86 b
UFPRPALM 1-121	<i>Agrobacterium fabrum</i>	13,10 c	6,50 de	53,76 b	7,20 b	25,33 c	3,00 ab	50,40 d	0,11	0,73	6,79 a	62,49 b	-
UFPRPALM 1-122	<i>Burkholderia</i> sp.	12,26 d	3,00 f	40,18 c	5,35 b	20,66 c	1,66 b	53,00 bc	0,13	0,08	5,35 ab	158,19 b	2397,02 a
Ab-V5	<i>Azospirillum brasilense</i>	16,50 a	6,50 de	53,28 b	6,35 b	64,66 ab	8,33 a	53,60 b	1,88	0,66	-	135,76 b	-
SmR1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	15,03 b	6,00 e	41,00 c	5,81 b	57,66 b	8,33 a	54,10 b	0,93	1,60	-	90,08 b	665,57 b
Controle	-	16,53 a	9,00 cd	53,00 b	6,81 b	79,33 a	8,00 ab	52,10 c	-	-	-	-	-
CV%	-	1,66	10,73	2,92	12,21	14,36	36,29	0,96	-	-	23,06	34,25	22,52

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

O isolado UFPRPALT 1-1 (*Agrobacterium tumefaciens*) promoveu um aumento significativo na altura das plântulas, massa seca de raízes e teor de nitrogênio total (NT) nos tecidos. Em termos de colonização, a população de bactérias epifíticas e endofíticas foi de 0 e $0,2 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹, respectivamente, demonstrando baixa capacidade de associação com as plântulas de trigo, embora seja uma bactéria endofítica com capacidade de síntese de AIA. O isolado UFPRPALM 1-121 (*Agrobacterium fabrum*) apresentou um efeito contrário nas plântulas inoculadas que obtiveram uma diminuição na altura, comprimento da raiz, massa fresca e NT, mesmo apresentando a presença epi e endofítica ($0,11$ e $0,73 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹) nas raízes do trigo, indicando um efeito negativo para o crescimento vegetal, compatível com a ação de um fitopatógeno (Pedrinho et al., 2010). O efeito negativo sobre o crescimento vegetal se daria pela produção de fitotoxinas que inibiriam o crescimento das plantas (BROWN e ROVIVA, 1999). Os genótipos vegetais diferem na produção de diferentes exsudatos que suportariam a atividade do inóculo, tolerando ou não substâncias fitotóxicas.

Outro isolado em trigo, UFPRPALT 1-14 (*Pantoea ananatis*) apresentou níveis medianos de produção de AIA para meio sem triptofano, mas distinto e alto para meio com triptofano (Tabela 14). Esta característica, no entanto, não foi suficiente para promover crescimento ou eficiente interação com plântulas de trigo que apresentaram médias menores que o controle para a altura, massa fresca e seca da parte aérea, massa fresca de raízes e teor de nitrogênio total nos tecidos. O número de bactérias epifíticas e endofíticas encontradas em plântulas de trigo após 5 dias de inoculação foi de $1,9 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹ epifiticamente e $0,133 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹ endofiticamente.

Na interação planta x bactéria, o fato das características morfofisiológicas permanecerem iguais ao controle poderia significar um efeito neutro ou não negativo para o desenvolvimento da planta. Embora o isolado UFPRPALM 2-77 (*Enterobacter asburiae*) tenha apresentado a maior população epifítica ($2,1 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹) não apresentou uma grande colonização endofítica nas plântulas avaliadas ($0,2 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹). O efeito desta estirpe sobre o crescimento vegetal foi expresso em redução da altura, massa fresca da parte aérea e massa fresca de raízes e nos teores de nitrogênio total.

Os controles bacterianos usados neste experimento (*Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*) apresentaram redução em algumas variáveis avaliadas em relação ao controle sem inoculação. A presença da bactéria *A. brasilense* promoveu média igual de altura e teores de NT superior ao controle. Para as demais, não houve efeito da presença bacteriana sobre o crescimento vegetal. A população epi e endofítica foi de 1,88 e $0,66 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹. Comparando-se com a população epi e endofítica obtida para a inoculação com *H. seropedicae*, observa-se uma população endofítica maior, demonstrando uma aptidão maior desta estirpe ($1,60 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹) em colonizar esta espécie vegetal. Quanto às variáveis avaliadas, a presença desta bactéria reduziu a altura, o comprimento das raízes e massa fresca da parte aérea, porém as plântulas tiveram médias iguais ou superiores nas variáveis avaliadas. Na literatura são descritos diversos trabalhos apontando efeitos benéficos da interação entre gramíneas e *A. brasilense* e *H. seropedicae* (KENNEDY et al., 1997; RONCATO-MACCARI et al., 2003). Os resultados obtidos apontam para respostas medianas destes controles na promoção de crescimento vegetal, com estirpes de maior performance entre os isolados.

Furnkranz, Muller e Berg (2009) demonstraram que bactérias do gênero *Pantoea* e *Burkholderia* sp. isoladas de plantas de girassol e sorgo, foram as mais promissoras nos experimentos *in vitro*. *Pantoea agglomerans* YS19, isolado em arroz, apresentou atividade de fixação de nitrogênio *in vitro*, síntese de quatro diferentes fitormônios, incluindo AIA com promoção de crescimento das plantas reinoculadas (FENG; SHEN; SONG, 2006).

Vários fatores podem interferir na interação planta x bactéria em condições *in vitro*. Os resultados obtidos para este ensaio de associação apontam para a recomendação de um período maior para que a associação possa promover efeitos benéficos ou deletérios às plantas. No presente estudo pode-se inferir que o período de cinco dias após a inoculação não foi suficiente para promover modificações evidentes nas raízes e/ou crescimento das plântulas de trigo, por não terem sido observadas alterações morfológicas nas raízes em todos os tratamentos aplicados (dados não mostrados). Long et al. (2008) observaram aumento na área radicular após sete dias de inoculação em plântulas oriundas de sementes inoculadas e germinadas *in vitro*.

Furlan (2013) relatou que a associação de plântulas de trigo com 28 dias após germinação, inoculadas *in vitro* com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* promoveram diferenças substanciais na morfologia radicular, aumentando a superfície e a massa fresca e seca das raízes. Neiverth (2011) também observou diferenças significativas entre os diferentes genótipos de trigo cv Coodetec associados com as mesmas estirpes. Possivelmente, um maior tempo de co-cultivo e estágio fenológico das plântulas sejam importantes fatores para se levar em consideração durante a avaliação da associação planta x bactéria *in vitro*. Seleções *in vitro* e *in vivo* podem contribuir para o melhor *screening* de isolados com potencial biofertilizante, principalmente em condições gnobióticas (KHALID; ARSHAD e ZAHIR, 2004; FURNKRANZ; MULLER e BERG, 2009).

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NAS CULTURAS DO TRIGO E DO MILHO: ENSAIO DE INOCULAÇÃO EM VASO

Dois tipos de solo, contrastantes quanto à fertilidade, foram usados neste experimento para verificar o efeito bacteriano no crescimento e nutrição vegetal. As variáveis; altura de plantas, massa fresca e seca e teores de nitrogênio total apresentaram-se maiores numericamente nos resultados obtidos em solo com alta fertilidade (AF) (Tabela 15). Tais resultados reforçam a importância agrônômica da nutrição mineral para o bom desempenho produtivo das espécies agrícolas. A população microbiana endofítica natural dos solos, também variou em relação à fertilidade dos mesmos. Solos com alta fertilidade (AF) apresentaram uma população microbiana que variou de 0,166 a $21,66 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹ (epifiticamente e endofiticamente, respectivamente) para o trigo e solos com baixa fertilidade (BF) não apresentaram população microbiana endofítica detectável (Tabela 16).

Foram observados resultados distintos para as variáveis avaliadas nos três grupos (I – *A. brasilense*, II – isolado UFPRPALT 1-14 e III – UFPRPALM 3-87), onde diferentes isolados (e/ou tipos bacterianos) e diferentes condições de fertilização (NPK; Sulfato de amônio e NPK+ Sulfato de amônio) foram usados. A presença bacteriana parece não ter contribuído para o aumento do crescimento vegetal em solos de alta fertilidade, não promovendo crescimento na biomassa distinto do controle sem fertilização (Tabela 15). Pelo contrário, em alguns casos a presença bacteriana diminuiu significativamente os resultados em relação ao

controle. Por outro lado, em solo de baixa fertilidade, a inoculação com os isolados bacterianos promoveu diferenças positivas e significativas.

Para o grupo I onde a estirpe bacteriana utilizada foi *A. brasilense*, as diferenças foram percebidas nos teores de NT acumulados em 45 dias em presença da bactéria e sob diferentes condições de fertilização (Tabela 15). Houve um acréscimo de 66% nos teores de NT (*A. brasilense*); 100% (*A. brasilense* + sulfato de amônio) e 154% (*A. brasilense* + NPK + sulfato de amônio). Os resultados demonstram um efeito potencializador da bactéria na absorção do fertilizante pela planta. Porém, se compararmos a aplicação de NPK + *Azospirillum*, observa-se uma redução de 20% nos valores de NT quando a bactéria é inoculada. Nas demais variáveis não houve uma resposta significativa, apenas a altura da planta foi incrementada em condição da presença do isolado + NPK + sulfato de amônio.

Tabela 15. Características morfofisiológicas de plantas de trigo inoculadas com os isolados, Palotina/PR – 2013

Grupo I	TRIGO							
	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF
	ALTURA (cm)		MF AÉREA (g)		MS AÉREA (g)		N TOTAL (g Kg ⁻¹)	
Controle	25,63 b	44,83 a	0,29 a	3,26 b	0,09 a	0,60 a	23,60 d	42,90 a
<i>A. brasilense</i>	27,53 b	37,63 c	0,40 a	2,57 b	0,11 a	0,53 a	39,30 bc	26,10 b
<i>A. brasilense</i> + NPK	23,40 b	39,87 bc	0,25 a	3,07 b	0,08 a	0,70 a	31,20 cd	21,30 b
<i>A. brasilense</i> + Sulfato	24,73 b	42,07 ab	0,35 a	5,11 a	0,09 a	0,86 a	47,50 b	41,50 a
<i>A. brasilense</i> + NPK + Sulfato	36,10 a	43,17 ab	1,18 a	4,11 ab	0,32 a	0,77 a	60,00 a	35,00 a
CV%	9,74	3,79	83,41	18,11	88,88	21,38	8,85	9,50
Grupo II	TRIGO							
	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF
	ALTURA (cm)		MF AÉREA (g)		MS AÉREA (g)		N TOTAL (g Kg ⁻¹)	
Controle	25,63 a	44,83 a	0,29 b	3,26 a	0,09 a	0,60 a	23,60 c	42,90 a
UFPRPALT 1-14	24,06 a	40,90 ab	0,40 ab	2,47 a	0,11 a	0,45 a	37,40 b	37,20 a
UFPRPALT 1-14 + NPK	26,73 a	39,83 ab	0,32 ab	2,49 a	0,08 a	0,53 a	41,90 b	19,10 b
UFPRPALT 1-14 + Sulfato	34,40 a	37,23 b	0,78 a	2,73 a	0,20 a	0,50 a	35,90 b	39,80 a
UFPRPALT 1-14 + NPK + Sulfato	29,80 a	43,50 ab	0,72 ab	3,92 a	0,16 a	0,71 a	60,10 a	43,00 a
CV%	14,88	6,83	34,20	23,02	34,97	24,49	6,28	8,86
Grupo III	TRIGO							
	BF	AF	BF	AF	BF	AF	BF	AF
	ALTURA (cm)		MF AÉREA (g)		MS AÉREA (g)		N TOTAL (g Kg ⁻¹)	
Controle	25,63 a	44,83 a	0,29 a	3,26 a	0,09 a	0,60 a	23,60 a	42,90 ab
UFPRPALM 3-87	25,53 a	41,33 b	0,32 a	2,23 a	0,11 a	0,43 a	29,20 a	31,00 bc
UFPRPALM 3-87 + NPK	27,76 a	44,66 a	0,37 a	3,39 a	0,10 a	0,61 a	40,90 a	28,40 c
UFPRPALM 3-87 + Sulfato	30,10 a	42,46 ab	0,40 a	2,88 a	0,10 a	0,51 a	39,80 a	38,20 abc
UFPRPALM 3-87 + NPK + Sulfato	31,76 a	44,73 a	1,19 a	4,71 a	0,24 a	0,74 a	61,80 a	50,90 a
CV%	13,00	2,54	79,88	28,73	64,56	28,14	14,99	13,29

BF: Baixa Fertilidade; AF: Alta Fertilidade. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

Este efeito potencializador do *A. brasilense* poderia reverter em ganhos para as plantas se o efeito fosse extrapolado para o final do ciclo fenológico, podendo o NT ser convertido em maior conteúdo proteico de grãos entre outros. O teor de nitrogênio total das plantas poderia estar diretamente correlacionada com a população endofítica. Estas bactérias que estariam dentro das plantas encontrariam condições mais favoráveis para fixar N_2 e transferi-lo para as células (BHATTACHARJEE; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2008).

Embora os teores de NT da planta representem apenas um indício da fixação biológica de nitrogênio, este processo é dependente de energia e é influenciado pela quantidade e pelas fontes de C exsudada pela planta hospedeira, além de outros compostos disponíveis como: NO_3 , O_2 e Mo (BASHAN e BASHAN, 2010; NAHER et al., 2011). Pedrinho et al. (2010) relataram que os efeitos da inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 nas plantas de milho promoveram aumentos na altura, massa seca e fresca das plantas. No entanto, Naiman et al. (2009) não observaram diferenças em variáveis produtivas de plantas de trigo quando inoculadas com *A. brasilense*. Em experimento realizado em vaso, Ferreira et al. (2010) relatam que a resposta à *A. brasilense* também foi dependente da cultivar.

A presença de fertilizantes na forma de NPK e sulfato de amônio apresentaram um efeito negativo sob a população microbiana epi e endofítica do isolado em questão (Tabela 16). Em solos de alta fertilidade (AF) a adição de fertilizantes (NPK e sulfato de amônio) parece ter diminuído a população epifítica em relação ao tratamento apenas com a presença da inoculação. No entanto, a população endofítica foi maior apontando para uma colonização interna das plantas de trigo. Exceção à regra, foi o tratamento onde a adubação de cobertura foi aplicado em sementes inoculadas, cujo número ficou em $5 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹. Aira et al. (2010) observaram uma proporcionalidade inversa na dosagem dos fertilizantes e atividade bacteriana. Shaharoon et al. (2008) observaram que bactérias do gênero *Pseudomonas* inoculadas em trigo com fertilizantes (NPK) tiveram sua eficiência reduzida proporcionalmente a concentração destes fertilizantes.

O grupo II consistiu da inoculação do isolado UFPRPALT 1-14 (*Pantoea ananatis*) de modo similar ao grupo I, os tratamentos não promoveram respostas positivas na altura, biomassa ou teores de NT em solos de AF, evidenciando que as condições de inoculação e fertilização não foram percebidas pelas plantas avaliadas. Parece evidente, que a adubação e inoculação foram desperdiçadas em solo de AF,

mas, em condições de BF, as respostas são distintas e positivas para os teores de NT, em especial. As plantas respondem ao aumento de fertilidade pela presença do NPK e sulfato de amônio ou de ambos. Além do efeito potencializador da fertilização (tratamentos com isolados + NPK; isolado + sulfato e isolado e ambos fertilizantes), a presença do isolado foi por si suficiente para que os níveis de NT fossem similares aos obtidos pelos tratamentos onde a fertilização com NPK foi aplicado e superior ao controle (Tabela 15).

O interessante é que, embora o isolado UFPRPALT 1-14 (*Pantoea ananatis*) não tenha promovido diferenças significativas no experimento *in vitro*, o mesmo promoveu em vaso uma resposta positiva. Esta resposta distinta pode ser possivelmente explicada por um efeito maior do período de crescimento, onde a bactéria pode associar-se por 45 dias e aumentar a população epi e endofítica ($23,33 \cdot 10^6$ e $15 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹, respectivamente) (Tabela 16). A presença de fertilização diminuiu a população epi e endofítica do isolado UFPRPALT 1-14 em plantas de ambos os solos (AF e BF). Este isolado foi obtido a partir de plantas de trigo e responderam à reinoculação. Egorenkova et al. (2000) citam que nos resultados por eles obtidos, isolados de trigo quando reinoculados, responderam melhor em trigo por uma aderência mais eficientemente daquele isolado.

Tabela 16. População microbiana endofítica em plantas de trigo e milho, Palotina/PR, 2012/2013

TRATAMENTOS	TAF	TBF	MBF	TAF	TBF	MBF
	EPIFÍTICA (x10 ⁶ UFC/mL)			ENDOFÍTICA (x10 ⁶ UFC/mL)		
Controle	0,16	-	31,66	21,66	-	33,33
<i>A. brasilense</i>	9,83	7	1,33	16,66	1,65	0,08
<i>A. brasilense</i> + NPK	2,33	43,33	25	95	33,33	5
<i>A. brasilense</i> + Sulfato	0,33	8,33	21,66	5	13,33	20
<i>A. brasilense</i> + NPK + Sulfato	0,50	38,33	1	25	23,33	20
UFPRPALT 1-14	4,66	23,33	26,66	138,33	15	45
UFPRPALT 1-14 + NPK	6	0,7	8,33	83,33	15	0,05
UFPRPALT 1-14 + Sulfato	0,66	20	181,66	85	5	290
UFPRPALT 1-14 + NPK + Sulfato	3,66	18,33	0,5	88,33	8,33	41,66
UFPRPALM 3-87	0,16	3,33	51,66	500	3,33	71,66
UFPRPALM 3-87 + NPK	0,83	16,66	5	26,66	21,66	8,33
UFPRPALM 3-87 + Sulfato	2	16	61,66	31,66	19,5	4
UFPRPALM 3-87 + NPK + Sulfato	2,5	1	35	23,33	0,4	27

TAF: Trigo em solo com alta fertilidade; TBF: Trigo em solo com baixa fertilidade; MBF: Milho em solo com baixa fertilidade.

O isolado UFPRPALM 3-87 avaliado no grupo III quanto aos efeitos da fertilização e inoculação no crescimento de plantas de trigo, apresentou resultados similares aos grupos anteriormente descritos em condições de solo com AF. Não houve uma resposta distinta e superior da presença de bactérias e fertilizantes em solos de alta fertilidade, embora a presença exclusiva da inoculação promoveu uma redução na altura e nos teores de NT das plantas, evidenciando um efeito negativo deste isolado nestas variáveis (Tabela 15).

A população epifítica apresentou aumentos da ordem de 15 vezes quando NPK e adubação de cobertura foram realizadas nas plantas de trigo. Já, a população endofítica observada nas plantas inoculadas com esta estirpe diminuiu em 88% pela presença dos fertilizantes (Tabela 16).

Em condições de BF, a presença da bactéria UFPRPALM 3-87 não acarretou em respostas significativamente superiores em relação ao controle. Embora este isolado tenha apresentado a melhor performance *in vitro*, em vaso não manteve as mesmas respostas. Em relação ao crescimento da população bacteriana, esta população foi maior em solos de BF e a presença da fertilização com NPK promoveu um aumento, na população bacteriana, da ordem de 5 (epifítica) e 6,5 vezes (endofítica). A adubação na forma de sulfato de amônio promoveu a diminuição desta população em 3% e em 10% quando comparado ao tratamento com NPK (Tabela 16).

Os resultados obtidos nos três grupos (I, II e III) onde diferentes isolados (e/ou tipos bacterianos) e diferentes condições de fertilização foram usados na semeadura do milho, a presença exclusiva da(s) bactéria(s) parece não ter contribuído para o aumento expressivo no crescimento vegetal em solos de baixa fertilidade (Tabela 17).

Os dados obtidos para o grupo I onde a estirpe bacteriana utilizada foi *A. brasilense*, as diferenças detectadas em todas as variáveis avaliadas, mas a resposta foi maior à presença de fertilizantes, especificamente do NPK e não à inoculação (*A. brasilense*) para as variáveis altura, massa fresca e seca de parte aérea. Quando o inóculo foi aplicado conjuntamente com o sulfato de amônio, maiores teores de NT foram observados nos tecidos vegetais. Estes resultados foram distintos e superiores em relação ao controle no grupo I, o que poderia ser possivelmente explicados pelo fato desta fertilização ter ocorrido apenas 15 dias antes da coleta dos dados, determinando fonte recente e ciclagem do N a partir do fertilizante, o que

explicaria os altos teores de NT. A inoculação promoveu uma performance similar ao controle para todas as variáveis avaliadas, porém, neste experimento, o incremento do NT pela presença bacteriana foi de 43% e para massa seca 10%, embora as outras variáveis altura e massa fresca apresentaram reduções quando a bactéria *A. brasilense* esteve presente (7% e 0,7%, respectivamente).

Tabela 17. Características morfofisiológicas de plantas de milho inoculadas com os isolados, Palotina/PR – 2012

TRATAMENTOS Grupo I	MILHO			
	ALTURA (cm)	MF AÉREA (g)	MS AÉREA (g)	N TOTAL (g Kg ⁻¹)
Controle	26,33 c	1,26 c	0,20 b	39,00 c
<i>A. brasilense</i>	24,33 c	1,27 c	0,22 b	56,00 bc
<i>A. brasilense</i> + NPK	58,33 a	12,88 a	1,48 a	83,00 b
<i>A. brasilense</i> + Sulfato	27,66 c	1,74 c	0,23 b	156,30 a
<i>A. brasilense</i> + NPK + Sulfato	48,00 b	7,47 b	1,31 a	140,00 a
CV%	9,00	23,06	21,77	15,36
Grupo II	ALTURA (cm)	MF AÉREA (g)	MS AÉREA (g)	N TOTAL (g Kg ⁻¹)
Controle	26,33 b	1,26 b	0,20 b	39,00 d
UFPRPALT 1-14	24,33 b	1,28 b	0,22 b	57,00 cd
UFPRPALT 1-14 + NPK	48,00 a	6,85 a	1,00 a	93,00 bc
UFPRPALT 1-14 + Sulfato	28,26 b	1,45 b	0,23 b	181,00 a
UFPRPALT 1-14 + NPK + Sulfato	46,33 a	5,36 a	0,87 a	125,00 b
CV%	15,39	23,02	24,49	18,95
Grupo III	ALTURA (cm)	MF AÉREA (g)	MS AÉREA (g)	N TOTAL (g Kg ⁻¹)
Controle	26,33 c	1,26 c	0,20 c	39,00 c
UFPRPALM 3-87	25,33 c	1,18 c	0,23 c	59,30 c
UFPRPALM 3-87 + NPK	52,00 a	8,80 a	1,43 a	102,60 b
UFPRPALM 3-87 + Sulfato	29,83 c	1,63 bc	0,23 c	159,00 a
UFPRPALM 3-87 + NPK + Sulfato	43,00 b	3,94 b	0,65 b	169,60 a
CV%	13,00	28,02	28,53	12,97

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.

Na comparação das três estirpes bacterianas ou os três grupos, pode-se observar respostas distintas em relação ao isolado, à planta e à adubação. A população epifítica e endofítica encontrada em plantas de milho nos diferentes tratamentos aplicados teve comportamento similar ao obtido para as plantas de trigo.

Plantas de milho avaliadas no grupo I apresentaram uma população epifítica diminuída pela presença de fertilizantes. Numericamente esta redução foi maior quando o NPK e sulfato de amônio foram aplicados demonstrando a sensibilidade das bactérias aos fertilizantes. Por outro lado, a população endofítica aumentou e manteve-se igual quando NPK + sulfato de amônio foram aplicados, e menor quando somente NPK foi aplicado durante a semeadura. Quando apenas o *A. brasilense* foi inoculado, a população epi e endofítica permaneceu baixa ($1,33$ e $0,08 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹). A baixa fertilidade natural do solo poderia reduzir as fontes nutricionais (fonte de carbono) desta bactéria, restringindo seu crescimento até que plantas (raízes) estariam aptas para realizar a associação.

As respostas obtidas para o grupo II e III, onde os isolados UFPRPALT 1-14 e UFPRPALM 3-87 foram avaliados quanto ao potencial de promoção de crescimento em vaso, apresentaram as mesmas tendências descritas para a bactéria controle (Tabela 17). As plantas de milho parecem ter respondido mais à adubação (especialmente ao NPK) que à presença do inóculo, onde houve diferença significativa entre o tratamento com NPK e controle em todos os parâmetros avaliados. Acréscimos maiores foram observados para o teor de NT, quando a inoculação + sulfato de amônio foram aplicados: 4,6 vezes para UFPRPALT 1-14 e 4 vezes para UFPRPALM 3-87. A mesma tendência foi observada para os tratamentos com inoculação + NPK + sulfato de amônio (3,2 vezes para UFPRPALT 1-14 e 4,3 vezes para UFPRPALM 3-87).

Os isolados avaliados apresentaram comportamentos distintos nas plantas de milho: a população microbiana ao redor da área radicular do isolado UFPRPALT 1-14 apresentou uma diminuição quando o NPK foi aplicado ($8,33$ e $0,05 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹, epifítica e endofítica, respectivamente). Exceção foi o tratamento onde o inóculo foi aplicado durante a semeadura e 30 dias após foi aplicado o fertilizante nitrogenado em cobertura ($181,6 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹). A colonização da área radicular pela UFPRPALT 1-14 não acrescentou benefícios nas variáveis avaliadas para as plantas de milho. Estes resultados discordam de Egorenkova et al. (2000) que afirmam que haveria uma maior afinidade do isolado em espécies das quais teriam sido previamente isolados.

Uma estirpe bacteriana será hábil para associar-se com as plantas se a mesma apresentar uma colonização eficiente e se adaptar fisiologicamente as condições de solo. Esta adaptação fisiológica seria também uma adaptação às

condições de baixos teores nutricionais e ou outras condições físico-químicas, alta eficiência no aproveitamento dos exsudatos liberados pelas plantas (VAN OVERBEEK et al., 1997). Berg (2009) citam que as bactérias para se associarem às plantas devem ser hábeis na colonização da planta: isto envolve reconhecimento, aderência, invasão, colonização e crescimento da população bacteriana.

Vários autores relataram sobre efeito do genótipo vegetal sobre as comunidades bacterianas (DOORNBOS et al., 2011; BOUFFAUD et al., 2011; KIRZINGER e STAVRINDES, 2012). A superfície radicular é composta pelas paredes celulares e mucigel formado por polissacarídeos e proteínas secretadas pelas plantas. Dey, Pal e Tilak (2012) citam que as plantas exsudam uma grande variedade de compostos: etileno, açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, polissacarídeos e enzimas e que os exsudatos das raízes dependem do genótipo vegetal sendo determinantes para a formação da comunidade rizosférica. Estes sinais gerariam uma especificidade na interação planta x bactéria que seria uma característica do genótipo e estirpe dependente (DROGUE et al., 2012). Os exsudatos atrairiam as bactérias até as raízes em diferentes níveis qualitativos e quantitativos (HARDOIM; OVERBEEK e ELSA, 2008; HARTMANN et al., 2009; SHELUD'KO et al., 2010).

Outros autores relatam ainda que a quantidade e composição dos exsudatos variam também ao longo da extensão da raiz e podem ser modificadas pelo estágio fenológico vegetal, pela concentração de nutrientes do solo e estresses bióticos e/ou abióticos (NEUMANN, 2007; MARSCHNER, CROWLEY e RENGEL, 2011; DEY; PAL e TILAK, 2012).

Bhattacharyya e Jha (2012) comentam que são os aminoácidos e açúcares que provêm fonte de energia e nutrientes para as bactérias, resultando em um maior crescimento populacional tanto na rizosfera quanto fora dela. Há também uma interação entre comunidades microbianas, pois uma comunidade poderia converter os exsudatos vegetais em outras formas aproveitadas por outras comunidades bacterianas. Oliveira et al. (2009) citam respostas de crescimento vegetal superiores para uso de mixes bacterianos com diferentes estirpes em cana-de-açúcar. Deste modo, a rizosfera é considerada um ambiente ecológico dinâmico de intensa interação planta x bactéria.

Neste trabalho, a população microbiana associada às plantas de milho foi maior numericamente nos controles quanto comparada à do trigo (198% e 53% respectivamente para epifíticas e endofíticas) (Tabela 16). Apesar de apenas 30% dos isolados tenham sido sequenciados, os dados demonstram uma maior competência do milho em criar uma comunidade bacteriana em redor de suas raízes, pois 60% dos isolados foram encontrados nesta espécie (Tabela 7 e 13). No milho são relatados que os exsudatos radiculares são compostos de 65% de açúcares, 33% de ácidos orgânicos e 2% de aminoácidos (BAUDOIN et al., 2003; AIRA et al., 2010). No trigo, são escassos os trabalhos que tratam sobre a caracterização de exsudatos em diferentes cultivares. Martin (1977) observaram quantidades de açúcares e aminoácidos variando entre 5,9 a 9,2% e 13,4 a 17,2%, respectivamente para a cv de trigo Gabo.

Vargas et al. (2012) observaram respostas distintas em cultivares de arroz inoculados com *Azospirillum brasilense*, demonstrando que as diferenças são do genótipo específico e ocorrem por expressão diferencial de alguns genes. Kumar et al. (2007), observou que em 9 isolados de *Azotobacter*, apenas 2 destes foram preferencialmente atraídos por trigo e 7 pelos exsudatos de plantas de algodão. A diferença seria pela composição de exsudatos em diferentes tipos de ácidos orgânicos.

Gough et al. (1997) demonstrou que a presença de outros compostos nos exsudatos como flavonóides (narigenina, murecila, quercetinas e daidzeinas) promoveriam quebras ou rupturas nas raízes laterais pelas quais ocorreria a colonização de alguns isolados como o que ocorre com *H. seropedicae*. Monteiro et al. (2012) também relataram a presença de proteínas T3SS usadas para translocar proteínas chamadas moléculas efetoras através do citoplasma de células eucarióticas, alterando o metabolismo celular em benefício da bactéria, no caso da patogenicidade ou de ambos, no caso da simbiose e associação.

A composição da comunidade epi e endofítica da rizosfera das plantas parece ser imprevisível. Hardoim, Overbeek e Elsa (2008) sugerem que o fator preponderante a ser levado em conta para a seleção de bactérias promotoras de crescimento, seria a fitosfera, ou seja, a especificidade vegetal em relação a microbiota deveria ser considerada mais que o fator solo.

Khalid, Arshad e Zahir (2004) quando avaliaram isolados selecionados com alta produção de AIA em trigo, observaram respostas distintas: na cv Pasban-90 as bactérias promoveram aumentos no comprimento de raízes, na altura, no peso seco e fresco da parte aérea e no número de perfilhos; mas na cv Inqlab-91 não foram observados aumentos nas variáveis avaliadas. Em experimentos em vaso, Vargas et al. (2012) ao avaliarem a performance de isolados de *Burkholderia kururiensis* em arroz observaram resultados negativos para o aumento das raízes laterais. Para plantas inoculadas com *A. brasilense*, os resultados foram positivos, mas distintos para os cv de arroz usados. Enquanto a cv IAC 4440 obteve um aumento da ordem de 75%, a cv IR42 obteve 143% de incremento radicular após 10 dias de inoculação, evidenciando a característica genótipo dependente da interação planta x bactéria. Asghar et al. (2002) demonstraram incrementos de 11 a 52% na massa seca de plantas de *Brassica* inoculadas com bactérias diazotróficas.

Os dados obtidos nos experimentos em vaso concordam com Egamberdieva, (2007) que relata que a capacidade associativa bacteriana é afetada pela condição nutricional dos solos, onde os melhores resultados foram obtidos em solos de baixa fertilidade. Os resultados obtidos para trigo em solos de AF e BF apontam para observação de que o estado nutricional das plantas teria implicações na eficiência da associação planta x bactérias pelo fato do estado nutricional vegetal influenciar a composição dos exsudatos que por sua vez influencia a produção de AIA (LOPER et al., 2012).

O tipo de solo é o maior determinante da microbiota endofítica (SINGH et al., 2009; LONG et al., 2008). Hueso, García e Hernández (2012) comentam que a atividade microbiana é afetada diretamente pela fertilidade e umidade dos solos. Outro fato a ser levado em consideração é o das plantas selecionarem uma comunidade microbiana em particular e a presença de outros microrganismos *in loco* influenciaria o sucesso da colonização. Em vaso, o solo AF apresentou uma microbiota residente. A dinâmica das comunidades microbianas em facilitar ou dificultar a instalação de espécies pela competição por nutrientes possui um papel importante no processo de colonização (LONG et al., 2008).

Este fato poderia explicar parcialmente a ausência de respostas da inoculação em solos AF onde uma microbiota residente já estava presente. Os mesmos autores observaram que dos 139 isolados obtidos de *Nicotina attenuata* apenas metade destas apresentaram efeitos benéficos para o crescimento vegetal, outras tiveram um efeito neutro ou patogênico.

Os resultados também demonstram que a população bacteriana é sensível à aplicação de fertilizantes com a inoculação e a maior população epifítica do isolado UFPRPALT 1-14 possivelmente poderia ser explicada pelo fato da aplicação do fertilizante ter ocorrido 30 dias após a inoculação, permitindo às bactérias o aumento populacional (Tabela 16). A mesma tendência foi observada para a populações endofíticas ($290 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹). Para a outra estirpe bacteriana UFPRPALM 3-87, observa-se para população epifítica a mesma tendência da UFPRPALT 1-14, porém a população endofítica diminuiu com a aplicação do(s) fertilizante(s) (Tabela 16).

Ensaio *in vitro* e em vasos são úteis para verificar a capacidade de recolonização das plantas hospedeiras e não hospedeiras com uma simples inoculação. Neste experimento, ambos os isolados foram capazes de inocular ambas espécies vegetais em diferentes condições de fertilidade. Interessante ressaltar, que o isolado UFPRPALM 3-87 (Tabela 16) foi hábil em recolonizar a planta hospedeira, pois a população endofítica ($71,6 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹) foi 14% maior que a epifítica em condições controle. Baldani et al. (1986) testaram diferentes isolados e concluíram que aquelas obtidas na mesma espécie vegetal (homólogas) foram mais eficientes do que as provenientes de espécies diferentes.

Em trigo e em milho, por serem espécies diferentes, poderiam ter diferenças na composição dos exsudatos, o que explicaria respostas distintas dos experimentos em vaso com as duas espécies, que foram inoculadas com as mesmas estirpes bacterianas.

A especificidade do hospedeiro parece ser fundamental na compreensão do processo de interação entre plantas e bactérias (KIRZINGER e STAVRINDES, 2012). O genótipo vegetal é quem modela a comunidade de bactérias PCV nos termos do tamanho e composição (BOUFFAUD et al., 2011). A propensão para colonizar e estimular o crescimento vegetal de um grupo restrito de plantas envolve mecanismos de reconhecimento do hospedeiro pela bactéria e aproveitamento pelas plantas dos benefícios desta interação, ou seja um ajuste sintonizado.

O uso crescente de fertilizantes nitrogenados e fosfatados necessários à produção agrícola e a alta exigência energética para a produção dos fertilizantes industriais, além do impacto ambiental provocado por lixiviação destes produtos, o uso de biofertilizantes ou bioinoculantes constitui uma alternativa promissora. As bactérias podem otimizar alguns processos naturais disponibilizando fertilizantes minerais que parcialmente supririam as necessidades das plantas através da FBN e solubilização de P, K e outros macro e micronutrientes (PEDRINHO et al., 2010; DAWWAM et al., 2013).

5 CONCLUSÕES

- 1 – Foi observada grande diversidade da comunidade bacteriana provenientes das três áreas de coleta em milho e trigo;
- 2 – As técnicas moleculares identificaram oito diferentes grupos geneticamente distintos sendo que estes foram posicionados em oito grupos filogenéticos;
- 3 – Não houve diferenciação dos gêneros e espécies bacterianas nos diferentes solos coletados e plantas iscas utilizadas;
- 4 – Os isolados puderam ser agrupados em diferentes grupos em relação à capacidade de solubilizar fosfato e produção de AIA;
- 5 – Foi observado o processo de colonização dos isolados nos experimentos *in vitro* e em vaso, e as populações epi e endofíticas foram distintas;
- 6 – No experimento *in vitro*, foram obtidas respostas distintas para a promoção de crescimento vegetal sendo que o isolado UFPRPALM 3-87 (*Burkholderia*) foi o que apresentou as melhores respostas para os parâmetros morfofisiológicos avaliados e o isolado UFPRPALT 1-14 (*Pantoea*) foi o que apresentou menor efeito promotor de crescimento;
- 7 – Em vaso, os isolados não apresentaram respostas de promoção de crescimento vegetal em solos de alta fertilidade;
- 8 – Em vaso e em condições de baixa fertilidade, o gênero *Pantoea* (UFPRPALT 1-14) foi o que apresentou a melhor performance em termos de aumentos dos teores de nitrogênio da parte aérea em plantas de trigo;
- 9 – Houve uma resposta diferencial da população microbiana entre espécies vegetais e condições de fertilização e/ou inoculação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser considerados como uma etapa preliminar no processo de desenvolvimento de biofertilizantes/bioinoculantes com isolados localmente obtidos para solos de baixa fertilidade. Apenas seis isolados sequenciados foram avaliados quanto a capacidade associativa e promoção de crescimento vegetal e ainda existem outros isolados promissores com altos índices de ISF e síntese de AIA que não foram avaliados. Além disso, será necessária a caracterização dos mesmos para outras atividades de promoção de crescimento vegetal como atividade da nitrogenase e síntese da AAC deaminase, entre outros. Porém, o grande desafio ainda será caracterizar isolados que promovam crescimento vegetal, que sejam viáveis economicamente em solos de alta fertilidade que é a realidade regional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, T. B. et al. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Can J Microbiol.**, v.47, p.916-924, 2001.
- AHMED, M. F. et al. Phosphorus adsorption in some Australian soils and influence of bacteria on the desorption of phosphorus. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 39, p. 1269-1294, 2008.
- AIRA, M. et al. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p.2276-228, 2010.
- ALI, B. et al. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 542-547, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 65p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-graduação em Agronomia. Seropédica-RJ, 2007.
- ALVES, G. C.; REIS, V. M. **Identificação de genótipos de milho responsivos à inoculação com a estirpe BR 11417 de *Herbaspirillum seropedicae***. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011. 24p. (Embrapa Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 73).
- ANDREWS JH, HARRIS RF. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annu Rev Phytopathol.**, v. 38, p. 145-180, 2000.
- ARAVIND, R. et al. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, v. 29, p. 318–324, 2010.
- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.
- ARZANESH, M. H. et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 197-205, 2011.

ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231-237, 2002.

ASIS JR, C. A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 19-23, 2003.

AZEVEDO, J. L. de. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S de; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia microbiana**. EMBRAPA, 1998. 486p.

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

BALDANI, V. L. D. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant Soil**, v.90, p.35-46, 1986.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BARRETT, P. B. et al. Combination of endophytic bacteria and resistant cultivars improves control of *Ralstonia* wilt of tomato. **Australasian Plant Pathol.**, v. 41, p. 189-195, 2012.

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

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

BASHAN, Y. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1938-1945, 1995.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. de. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth e a critical assessment. **Adv. Agron.**, v.108, p.77-135, 2010.

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. et al. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promoting bacilli isolated from wheat fields in southern Brazil. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 244-250, 2008a.

BENEDUZI, A. 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, 2008b.

BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, p. 11-18, 2009.

BERNARDES, F. S. **Diversidade bacteriana endofítica associada à *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com sinais de Greening**. 2010. 60p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Programa de Pós-graduação em Ciências. Piracicaba-PR, 2010.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p.399-406, 1976.

BETANCOURT, D. A. et al. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3471-3480, 2008.

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

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii sn10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biol Fertil Soils**, v. 48, p. 173-182, 2012.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J Microbiol Biotechnol.**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BHERING, S. B.; SANTOS, H. G. dos (Ed.). **Mapa de solos do estado do Paraná: legenda atualizada**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos; Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 74p.

BOUFFAUD, M. L. et al. Is diversification history of maize influencing selection of soil bacteria by roots? **Mol. Ecol.**,v.21, p.195-206, 2011.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. The rizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v.66, p.1-102, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Trigo**. Brasília - DF, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>>. Acesso em: 8 fev. 2013.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1982. p. 595-624

BRENNER, D. J. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2^a ed. Springer, 2007. v. 2. 1134p.

BRUGGER, S. D. et al. 16S rRNA terminal restriction fragment length polymorphism for the characterization of the nasopharyngeal microbiota. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-8, 2012.

BURRIS, R. Nitrogenases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, May 25, 1991, p.9339-9342. 1991.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

CABALERRO-MELLADO, J.; CARCAÑO-MONTIEL; M.; MARCARÚA-ESPARZA, M.A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, v. 13, p. 243-253, 1992.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. 360p.

CARDOSO, I. C. M. et al. Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Rev. Ciênc. Agrovet.**, v. 9, n. 2, p. 178-186, 2010.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Embrapa Soja Documentos, 139).

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endolíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 132p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP, 2005.

CHEN, Y. P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33-41, 2006.

CHENG, H. R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 1, p. 55-59, 2006.

CHUNG, H. et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1970-1974, 2005.

CID, L.P.B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180p.

COELHO, L. F. et al. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1413-1420, 2007.

COLTELLA, L. et al. Advancement in the routine identification of anaerobic bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 32, p. 1183-1192, 2013.

COELHO, A. M. et al. Nutrição e Adubação do Milho. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Eds.). **Cultivo do Milho**. Embrapa Milho e Sorgo: Sistemas de Produção, 2000. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/fera_duba.htm>. Acesso em: 10 abr. 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, sétimo levantamento, abr. 2013. Brasília: Conab, 2013.

COMPANT, S. 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.

COSTA, E. et al. Water activity, temperature, and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. **Can J Microbiol.**, v. 48, p. 1082-1088, 2002.

CREUS, C.M. et al. Water relations in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings under osmotic stress. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 238-244, 1998.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** – estatística experimental e matrizes. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. v. 1. 285 p.

CRUZ, C. D. **Programa Genes** – diversidade genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v.1. 278 p.

CUNHA, G. R. **Oficina sobre trigo no Brasil**: bases para a construção de uma nova triticultura brasileira. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 192p.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, A. Biogeochemical processes in the continental slope of Bay of Bengal: I. Bacterial solubilization of inorganic phosphate. **Rev. Biol. Trop.**, v. 55, n. 1, p. 1-9, 2007.

DAWWAM, G. E. et al. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, n. 2, p. 195–201, 2013.

DEVAU, N. et al. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1183-1197, 2010.

DEY, R.; PAL, K. K.; TILAK, K. V. B. R. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria. **The National Academy of Sciences, India, Sect. B Biol. Sci.**, v. 82, n. 3, p. 341-352, 2012.

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.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1995. 60p.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

D'ONOFRIO, A. et al. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. **Chemistry and Biology**, v. 17, p. 254-264, 2010.

DOORNBOS, R.F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rizosphere. A review. **Agron. Sustain. Dev.**, v.32, p.227-243, 2012.

DOTTO, A. P. et al. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

DUARTE, J. O. Introdução e Importância Econômica do Milho. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Eds.). **Cultivo do Milho**. Embrapa Milho e Sorgo: Sistemas de Produção, 2000. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/index.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2013.

DUFFY, B.; KEEL C.; DEFAGO, G. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 3, p. 1836-1842, 2004.

DROGUE, B. et al. Wich specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plant? **Research in Microbiology**, v. 163, p. 500-510, 2012.

DRUMMOND, M.; WALMSLEY, J.; KENNEDY, C. Expression from the *nifB* promoter of *Azotobacter vinelandii* can be activated by *nifA*, *VnfA*, or *AnfA* transcriptional activators. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 3, p. 788-792, 1996.

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

EGAMBERDIEVA, D. et al. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2008.

EGAMBERDIEVA, D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. **Acta Physiol Plant**, v. 31, p. 861-864, 2009.

EGORENKOVA, I. V. et al. Investigation of the initial stages of interaction of the bacterium *Azospirillum brasilense* with wheat seedling roots: adsorption and root hair deformation. **Microbiol.**, v.69, p.103-108, 2000.

ELBELTAGY, A. et al. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285-5293, 2001.

EL-KOMY, H. M. A. Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. **Food Technol. Biotechnol.**, v.43, n.1, p.19-27, 2005.

ELMETICH, C. et al. Regulation of *nif* gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 847-852, 1997.

EMBRAPA TRIGO. **O trigo no Brasil**. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/aunidade/trigo_brasil.htm Acesso em: 22 set. 2013.

ESSÉN, S. A. et al. Siderophore production by *pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5857-5864, 2007.

ESTRADA, P. et al. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Can. J. Microbiol.**, v. 48, p. 285-294, 2002.

FALLIK, E.; CHAN, Y. K.; ROBSON, R. L. Detection of alternative nitrogenases in aerobic gram-negative nitrogen-fixing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 1, p. 365-371, 1991.

FARINA, R. et al. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44-52, 2012.

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, A. O. **Bactérias endofíticas e fungo micorrízico arbuscular na produção de mudas cítricas**. 2012. 85p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônomo, Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical. Campinas, SP, 2012.

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

FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2006. 432p.

FERREIRA, A. et al. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 287, p. 8-14, 2008.

FERREIRA, J. S. et al. **Avaliação de duas variedades de trigo inoculadas com bactérias diazotróficas na ausência ou presença de doses de N-fertilizante, em condições de casa-de-vegetação**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 20p.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M.V.B. et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa, 2010. p. 387-414.

FILOSO, S. et al. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. **Biogeochemistry**, v. 79, p. 61-89, 2006.

FRANCHE, F.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**, v. 321, p. 35–59, 2009.

FURLAN, F. **Efeito do déficit hídrico em duas variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) em associação com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. 2013. 78p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Marechal Cândido Rondon-PR, 2013.

FURNKRANZ, M.; MULLER, H.; BERG, G. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 4, p. 149-155, 2009.

GALDIANO JR, R. F. et al. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 729-737, 2011.

GALVÃO, P. G. et al. **Interação plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 68p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 270).

GARBEVA, P.; VEEN, J. A.; 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.

GERMANO, M. G. 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.

GERMIDA J. J. et al. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, n.1, p.43-50, 1998.

GIROTTTO, E. **Produtividade de trigo e milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense***. Ibirubá: IFRS - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 2012. 14p.

GIUNTINI, E. et al. Genetic diversity of dinitrogen-fixing bacterial communities in soil amended with olive husks. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 83-88, 2006.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1-7, 2005.

GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **Eur J Plant Pathol**, v. 119, p. 329-339, 2007.

GOMES, M. L. **Bactérias diazotróficas endolíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no Estado de Roraima**. 2009. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Boa Vista, RO, 2009.

GOUGH, C. et al. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.10, p.560-570, 1997.

GRABBLE, R.; KLOPPROGGE, K.; SCHMITZ, R. A. Fnr is required for *nifL*-dependent oxygen control of *nif* gene expression in *klebsiella pneumonia*. **The Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p.1385-1388, 2001.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.

GUEYE, F. et al. Genetic diversity and distribution of *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* strains associated with the herb legume *Zornia glochidiata* sampled from across Senegal. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 387-399, 2009.

GYANESHWAR, P. et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2634-2645, 2001.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann Microbiol**, v. 60, p. 579-598, 2010.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; ELSA, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, n.10, p.463-471, 2008.

HARTMANN, A.; BASHAN, Y. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB). **Eur J Soil Biol.**, v.45, p.1-2, 2009.

HENRIQUES, M. M. P. **Comparação de métodos para identificação de bactérias filamentosas responsáveis pelo fenómeno de *bulking* numa ETAR.** 2010. 106p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Programa de Pós-graduação em Engenharia do Meio Ambiente, Lisboa, 2010.

HINSINGER, P. et al. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. **Plant Soil**, v. 321, p. 117–152, 2009.

HOPER, H.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax. **Soil Bid. Biochem.**, v.27, n.7, p. 955-967, 1995.

HSIEH, T. F.; HUANG, H. C.; ERIKSON, R. S. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. **J Phytopathol.**, v. 153, p. 608-614, 2005.

HUESO, S.; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T. Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 50, p. 167-173, 2012.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

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

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

HUREK, T.; EGENER, T.; REINHOLD-HUREK, B. Divergence in nitrogenases of *Azoarcus* spp., proteobacteria of the beta subclass. **The Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 13, p. 4172-4177, 1997.

ILYAS, N.; BANO, A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. **Biol Fertil Soils**, v. 46, p. 393-406, 2010.

INUI, R. N. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar**. 2009. 90p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Jaboticabal-SP, 2009.

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

JI, S.H.; GURURANI, M.A.; CHUN, S.C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131300089X#>>.

JIMÉNEZ-SALGADO, T. 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.

JIMÉNEZ, D. J.; MONTAÑA, J. S.; MARTÍNEZ, M. M. Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable-grown Colombian soils. **Braz J Microbiol.**, v.42, n.3, p.846-858, 2011.

JURKEVITCH, E.; HADAR, Y.; CHEN, Y. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 119-124, 1992.

KARADENIZ, A.; TOPCUOGLU, S. F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1061–1064, 2006.

KAVINO M. et al. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biol Biochem**, v. 39, p. 1087-1098, 2007.

KENNEDY, I. R. 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.

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.

KHAN, M. S. et al. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbial strategies for crop improvement**. Dordrecht: Springer, p. 105-132, 2009.

KIRCHOFF, G. et al. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.**, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KIRZINGER, M. W. B.; STAVRINIDES, J. Host specificity determinans a genetic continuum. **Trends Microbiology**, v.20, p.88-93, 2012.

KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 887-891, 1997.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C.M. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T. N. **Microbial root endophytes**, Berlin: Springer-Verlag, 2006. p.33-52

KREY, T. et al. Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 124-130, 2013.

KROME, K. et al. Soil bacteria and protozoa affect root branching via effects on the auxin and cytokinin balance in plants. **Plant Soil**, v. 328, p. 191-201, 2010.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-51, 2004.

KUMAR, R. et al. Establishment of *Azotobacter* on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **J. Basic Microbiol.**, v.47, p.436-439, 2007.

KUSKE, C. R. et al. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1854-1863, 2002.

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

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LACAVA, P. T. et al. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.

LACAVA, P. T. et al. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *Pauca*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 521-528, 2008.

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.

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.82, p.6955-6959, 1985.

LASLO, E. et al. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. **Crop Protection**, v. 40, p. 43-48, 2012.

LATOUR, X. 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.

LEE, S. et al. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis Genes. **Journal of Bacteriology**, v.186, n. 16, p. 5384-5391, 2004.

LI, C. H. et al. Biocontrol of verticillium wilt and colonization of cotton plants by an endophytic bacterial isolate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 641-651, 2012.

LONG, H. H. et al. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner, phytohormone manipulations do not result in common growth responses. **PLoS One**, v.3, p.2-27, 2008.

LOPES, A. A. C. et al. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. In: Simpósio Nacional sobre o Cerrado, 9. e Simpósio Internacional Savanas Tropicais, 2., 2008, Brasília. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

LOPER, J. E. et al. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. **PLoS Genet.**, v.8, P. 1-27, 2012.

LOVELESS, T. M.; SAAH, J. R.; BISHOP, P. E. Isolation of nitrogen-fixing bacteria containing molybdenum-independent nitrogenases from natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4223-4226, 1999.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUDUEÑA L. M. et al. Biocontrol bacterial communities associated with diseased peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. **Eur J Soil Biol**, v. 53, p. 48-55, 2012.

MACHADO, H. B. et al. The ntrBC genes of *Azospirillum brasilense* are part of nifR3-like-ntrB-ntrC operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 674-684, 1995.

MAGALHÃES. P. C. et al. **Fisiologia do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 23p. (Embrapa. Circular Técnica, 22).

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endolíticas em cana-de-açúcar**. 2005. 93p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Curitiba, PR, 2005.

MAGNANI, G.S. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Curitiba, PR, 2005.

MARIANO, R.L.R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. In: ACADEMIA PERNAMBUCANA DE CIÊNCIA AGRONÔMICA, Recife, 2004. **Anais...** Recife, 2004. p. 89-111.

MARIN, V. A. et al. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**, 1999. Embrapa Agrobiologia - Documentos (INFOTECA-E). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/598661>>. Acessado em: 30 jul. 2013.

MARRA, L.M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Sci. Agric.**, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011.

MARRA, L.M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant Soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 883-894, 2011.

MARTIN, J. K. **The chemical nature of the carbon-14-labelled organic matter released into soil from growing wheat roots: Effects of soil micro-organism**. In: Soil Organic Matter Studies. International Atomic Energy Agency, Vienna, v.1, 1977. p.197-203.

MAVINGUI, P. et al. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1894-1903, 1992.

MEDRADO, A. T. **Protocolo para determinação de proteínas totais LOWRY et al., 1951 adaptado por Andreone Teles Medrado**, 2011. Disponível em: [http://andreonetm.webnode.com.br/news/metodo%20para%20determina%C3%A7%C3%A3o%20de%20proteinas%20totais%20\(lowry,%201954\),%20por%20andreone%20medrado/](http://andreonetm.webnode.com.br/news/metodo%20para%20determina%C3%A7%C3%A3o%20de%20proteinas%20totais%20(lowry,%201954),%20por%20andreone%20medrado/) Acesso em: 25 jan. 2012.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microb. Ecol.**, v. 51, p. 326-335, 2006.

MENDES, R. et al. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, 2007.

MENGONI, A. et al. Fluctuation of endophytic bacteria and phytoplasmosis in elm trees. **Microbiol. Res.**, v.158, p.363-369, 2003.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, 2012.

MONTEIRO, R. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microspical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v.356, p.175-196, 2012.

MONTESINOS, E. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. **Int Microbiol.**, v. 6, p. 221–223, 2003.

MORAIS, T. P. **Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum brasilense* em híbridos de milho**. 2012. 83p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Uberlândia-MG, 2012.

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

MOREIRA, L.; CORREIA, I. S. **Identificação e análise computacional do agrupamento de genes envolvidos na biossíntese de cepaciano produzido por bactérias do complexo *Burkholderia cepacia***. 2005. Disponível em: <<http://kdbio.inesc-id.pt/~atf/bioinformatics.ath.cx/bioinformatics.ath.cx/index23df.html?id=74>>. Acesso em: 13 out. 2013.

MOREIRA, S. F. M. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular General Genetics**, v.233, p.1-9, 1992.

NAHER, U. A. et al. Effect of root exuded specific sugars on biological nitrogen fixation and growth promotion in rice (*Oryza sativa*). **Aust. J. Crop Sci.**, v.5, p.1210-1217, 2011.

NAIMAN, A.D.; LATRÓNICO, A.; SALAMONE, I.E.G. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 44-51, 2009.

NAUTIYAL, C. S., et al. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 291-296, 2000.

NEILANDS, J.B.; NAKAMURA, K. Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. In: WINKELMANN, G. (Ed.). **CRC handbook of microbial iron chelates**. Florida: CRC Press, 1991. p.1-14.

NEIVERTH, A. **Desempenho de genótipos de trigo associados com *herbaspirillum seropedicae* em relação à fixação biológica de nitrogênio e promoção do crescimento vegetal**. 2011. 80p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, PR, 2011.

NEIVERTH, W. **Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo**. 2012. 107p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, PR, 2012.

NERONI, R. F. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 60p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Programa de Pós-graduação em Agronomia, Piracicaba, SP, 2007.

NEUMANN, G. Root exudates and nutrient cycling. In: Marschner, P., Rengel, Z.(Eds.), **Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems**. Berlin: Springer, 2007. p.123-158.

NEUMANN, G.; GEORGE, T. S., PLASSARD, C. Strategies and methods for studying the rhizosphere – the plant science toolbox. **Plant Soil**, v. 321, p. 431-456, 2009.

NUNES, C. et al. Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. **Int J Food Microbiol**, v. 70, p. 53-61, 2001.

NUNES, C. et al. Post-harvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on golden delicious apples. **J Appl Microbiol.**, v. 92, p. 247-255, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 106-113, 2009.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos**. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Universidade Estadual de Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_08_7.pdf>. Acesso em: 31 out. 2011.

ORR, C. H. 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.

PAVLO, A. et al. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, v. 56, n. 1, p. 43-49, 2011.

PEDRAZA, R. O. et al. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 233, n. 1, p. 15-21, 2004.

PEDRINHO, E. A. N. identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 87p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal-SP, 2009.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2011.

PEDROSA, F. O. et al. Regulation of *nif* genes expression. In *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. In: SKINNER, F.A. (eds.). **Nitrogen fixation with non-legumes**, Kluwer Academic Publishers, 1989, p.155-163.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PENYALVER, R. Iron-Binding Compounds from *Agrobacterium* spp.: biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 produces a hydroxamate siderophore. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 654-664, 2001.

PÉREZ, E. et al. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 2905–2914, 2007.

PICARD, C.; BOSCO, M. Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 349–357, 2005.

PINTO JR, A. S. **Redução da adubação nitrogenada na cultura do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense***. 2013. 113p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon-PR, 2013.

POTRICH, D. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; SCHRANK, I. S. Partial characterization of *nif* genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1105-1113, 2001.

PRAKAMHANG, J. et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 42, p. 141-149, 2009.

PRESS, C.M. et al. Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance. **Phytopathology**, v. 91, p. 593-598, 2001.

RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1991. 343p.

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

RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 217–224, 2012.

REIS JR, F. B. et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 33p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 51).

REIS JR, F. B. TEIXEIRA, K. R. S. REIS, V. M. **Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *Brachiaria***. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004, 41p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 117).

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 14p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 232).

REIS, V. M., et al. Diazotróficos associativos e de vida livre: avanços e aplicações biotecnológicas. In: FIGUEIREDO, M.V.B. et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa, 2010. p.415-437.

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

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytopatológica**, v. 12, p. 16, 1986.

RODRIGUES, L. S. 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.

RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v. 302, p. 249-261, 2008.

RODRÍGUEZ, H. et al. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, p. 15-21, 2006.

ROESCH, L. F. W. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 31, p. 367-1380, 2007.

ROJAS-TAPIAS, D. et al. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 264-272, 2012.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279p.

RONCATO-MACCARI, L. D. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

RUIZ, A. et al. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1981-1987, 2000.

RYU, R. J.; PATTEN, C. L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. **J Bacteriol.**, v.190, p.7200-7208, 2008.

SACHDEV, D. et al. Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of *Acinetobacter* community from the rhizosphere of wheat. **Microbiological Research**, v. 165, p. 627-638, 2010.

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

SALA, V. M. R. et al. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.6, p.833-842, 2007.

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. In: SILVEIRA, A. P. D. D.; FREITAS, S. D. S. (Ed.). **Microbiologia do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas, 2007. p. 97-115

SALA, V. M. R. et al. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1099-1106, 2008.

SALAMONE, I. E. G. et al. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 196- 204, 2012.

SALEEM, M. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, p. 635-648, 2007.

SANON, A. et al. Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. **Plant Soil**, v. 321, p. 259–278, 2009.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 743-767, 2013.

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.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Lett Appl Microbiol**, v. 20, p. 282–285, 1995.

SCHOEBITZ, M.; CEBALLOS, C.; CIAMPI, L. Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2013.

SEVILLA, M. et al. Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 871-874, 1997.

SHAHAROONA, B. et al. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase rhizobacteria extenuates ACC-induced classical triple response in etiolated pea seedlings. **Pak. J. Bot.**, v. 38, n. 5, p. 1491-1499, 2006.

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. 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.; JOHRI, B.N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological Research**, v. 158, p. 243-248, 2003.

SHEUD'KO, A. V. et al. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility. **Microbiology**, v.79, n.5, p.688-695, 2010.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SILVA, K. et al. Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. **Sci. Agric.**, v. 68, n. 5, p. 518-525, 2011.

SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da reserva biológica Serra dos Toledos, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 359-371, 2011.

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

SOBOLEV, V. S.; ORNER, V. A.; ARIAS, R. S. Distribution of bacterial endophytes in peanut seeds obtained from axenic and control plant material under field conditions. **Plant Soil**, v. 371, p. 367-376, 2013.

SONG, O. et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 151-156, 2008.

SOUZA, M. L. de. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 21, p. 28-31, 2001.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215-252.

SPAEPEN, S. et al. Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. **FEMS Microbiol Lett**, v. 291, p. 195–200, 2009.

SRINIVASA, C.; SHARANAIHA, U.; SHIVAMALLU, C. Molecular detection of plant pathogenic bacteria using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 44, p. 217-223, 2012.

STACKEBRANDT, E. 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.

STETS, M. I. et al. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 165, p. 167-174, 2013.

STOLTZFUS, J. R. et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and soil**, v. 194, p. 25-36, 1997.

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

SUN, L. et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S r DNA sequences analysis. **Microb. Ecol.**, v. 55, p. 415-424, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TAN, Z. Y. et al. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, p. 2839-2848, 2009.

TAURIAN, T. et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, v. 329, p. 421-431, 2010.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F. **Diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 22p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33).

TORRES, A. **Diversidade genética de enterobactérias endofíticas de diferentes hospedeiros e colonização de *Catharantus roseus* por endófitos expressando o gene gfp**. 2005. 153p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Piracicaba-PR, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VAIDYA, G. S. et al. Organic matter stimulates bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Bauhinia purpurea* and *Leucaena diversifolia* plantations on eroded slopes in Nepal. **Restor. Ecol.**, v.16, p.79-87, 2008.

VAN OVERBEEK, L. S. et al. Induced reporter gene activity, enhanced stress resistance, and competitive ability of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain released into a field plot planted with wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.5, p.1965-1973, 1997.

VANINHA. **Meu Deus é bom pra mim.** Disponível em: <<http://www.ouvirmusica.com.br/vaninha/#mais-acessadas/880361>> Acesso em: 22 out. 2013.

VARGAS, L. et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant Soil**, v.356, p127-137, 2012.

VENIERAKI, A. et al. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microb Ecol.**, v.61, p.277-285, 2011.

VERMELHO, A. B. et al. **Práticas de microbiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 239p.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, n. 255, p. 571-586, 2003.

VIANA, T. O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.)** cultivado em Vitória da Conquista - BA. 2012, 97p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Vitória Da Conquista-BA, 2012.

VIDEIRA, S. S. et al. Identificação e avaliação da diversidade de novos isolados de bactérias diazotróficas em plantas de arroz (*Oryza sativa*). **Revista Universidade Rural**, v. 24, n. 2, p. 35-40, 2004.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 80p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 234).

WANG, C. et al. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B in axenically grown cucumber. **Plant Cell Environmental**, n. 16, p. 579-585, 1993.

WEBER, O. B. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, p. 103-113, 1999.

WEYENS, N. et al. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 591-598, 2009.

WIDJOJOATMODJO, M. N.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J. Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 3002-3007, 1994.

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

YANG, P. et al. Combining antagonistic endophytic bacteria in different growth stages of cotton for control of Verticillium wilt. **Crop Protection**, v. 47, p. 17-23, 2013.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of photrophic *Rhizobium* strain BTai1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a16S rRna segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, 1991.

ZAIDI, A. et al. Recent advances in plant growth promotinon by phosphate-solubilizing microbes. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.). **Microbial strategies for crop improvement**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 105-132.

ZAKHAROVA, E. A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 3, p. 572-576, 1999.

ANEXOS

ANEXO A: MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

MEIO DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA; VICTOR, 1986)

- 2,0 g L⁻¹ de Glicose
- 1,0 g L⁻¹ de Ácido Málico
- 1,5 g L⁻¹ de Peptona Bacteriológica
- 1,0 g L⁻¹ de Extrato de Levedura
- 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄
- 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 6.0 com KOH (10%)
- 20 g L⁻¹ de ágar

MEIO LG (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

- 20,0 g L⁻¹ de Sacarose
- 0,05 g L⁻¹ de K₂HPO₄
- 0,15 g L⁻¹ de KH₂PO₄
- 0,02 g L⁻¹ de CaCl₂
- 0,20 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O
- 0,002 g L⁻¹ de Na₂MoO₄ · 2H₂O
- 0,01 g L⁻¹ de FeCl₃ · 2H₂O
- 5,0 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em etanol)
- 1,00 g L⁻¹ de CaCO₃
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 7.0 com NaOH
- 15 g L⁻¹ de ágar

MEIO LGD (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

- 20,0 g L⁻¹ de Glucose
- 0,05 g L⁻¹ de K₂HPO₄
- 0,15 g L⁻¹ de KH₂PO₄
- 0,01 g L⁻¹ de CaCl₂
- 0,20 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O
- 0,002 g L⁻¹ de Na₂MoO₄ · 2H₂O
- 0,01 g L⁻¹ de FeCl₃ · 2H₂O
- 2,0 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em etanol)
- 0,01 g L⁻¹ de NaHCO₃
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 7.0 com NaOH
- 15 g L⁻¹ de ágar

MEIO NFb (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

- 5,0 g L⁻¹ de Ácido Málico
- 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄
- 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O
- 0,1 g L⁻¹ de NaCl
- 0,02 g L⁻¹ de CaCl₂ · 2H₂O
- 2,0 mL de micronutrientes (solução A)
- 2,0 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N KOH)
- 4,0 mL de FeEDTA (solução 1,64%)
- 1,0 mL de vitaminas (solução B)
- 4,5 g L⁻¹ de KOH
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 6.5 ou 6.8 com NaOH
- 15 g L⁻¹ de ágar

Solução A - Micronutrientes para 1000 mL:

- 0,04 g de CuSO₄ · 5H₂O
- 1,20 g de ZnSO₄ · 7H₂O
- 1,40 g de H₃BO₃
- 1,00 g de Na₂MoO₄ · 2H₂O
- 1,175 g de MnSO₄ · H₂O
- 1000 mL de água destilada

Solução B – Vitaminas para 100 mL:

- 10 mg de biotina
- 20 mg de piridoxol-HCl

Dissolver em banho maria e completar o volume para 100 mL com água destilada e manter a solução em geladeira.

MEIO JNFb (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

- 5,0 g L⁻¹ de Ácido Málico
- 0,6 g L⁻¹ de K₂HPO₄
- 1,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄
- 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O
- 0,1 g L⁻¹ de NaCl
- 0,02 g L⁻¹ de CaCl₂ · 2H₂O
- 2,0 mL de solução de micronutrientes (idem meio NFb)
- 2,0 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N KOH)
- 4,0 mL de FeEDTA (solução 1,64%)
- 1,0 mL de vitaminas (idem meio NFb)
- 4,5 g L⁻¹ de KOH
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 5.8 KOH
- 17 g L⁻¹ de ágar

MEIO LGI (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

- 5,0 g L⁻¹ de Sacarose
- 0,2 g L⁻¹ de K₂HPO₄
- 0,6 g L⁻¹ de KH₂PO₄
- 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O
- 0,02 g L⁻¹ de CaCl₂ · 2H₂O
- 0,002 g L⁻¹ de Na₂MoO₄ · 2H₂O
- 5,0 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N KOH)
- 4,0 mL de FeEDTA (solução 1,64%)
- 1,0 mL de vitaminas (idem meio NFb)
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 6.0 a 6.2 com H₂SO₄
- 15 g L⁻¹ de ágar

MEIO LGI-P (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

- 100 g L⁻¹ de Sacarose
- 0,2 g L⁻¹ de K₂HPO₄
- 0,6 g L⁻¹ de KH₂PO₄
- 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O
- 0,02 g L⁻¹ de CaCl₂ · 2H₂O
- 0,002 g L⁻¹ de Na₂MoO₄ · 2H₂O
- 5,0 mL de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N KOH)
- 0,01 g L⁻¹ de FeCl₃ · 6H₂O
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 5.5 com ácido acético
- 17 g L⁻¹ de ágar

MEIO NBRIP (NAUTIYAL et al., 2000)

- 10 g L⁻¹ Glicose
- 2,5 g L⁻¹ CaHPO₄
- 0,2 g L⁻¹ NaCl
- 0,1 g L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O
- 0,2 g L⁻¹ KCl
- 0,5 g L⁻¹ extrato de levedura
- 0,002 g L⁻¹ MnSO₄ · 7H₂O
- 0,002 g L⁻¹ FeSO₄ · 7H₂O
- 0,024 g L⁻¹ azul de bromofenol
- 1000 mL de água destilada
- pH ajustado para 7.0
- 15 g L⁻¹ de ágar

SOLUÇÃO A (MEDRADO, 2011)**Para quantificação de proteínas totais**

- 1,0 mL do Reativo B
- 1,0 mL do Reativo C
- Completa para 100mL⁻¹ com Reativo A

Reativo A:

- 20 g L⁻¹ de Na₂CO₃
- 4,0 g L⁻¹ de NaOH
- 1000 mL de água destilada

Reativo B:

- 1,0 g L⁻¹ de CuSO₄
- 100 mL de água destilada

Reativo C:

- 2,0 g L⁻¹ Tartarato de Sódio e Potássio
- 100 mL de água destilada

HIPOCLORITO ACIDIFICADO

- 20 mL de Solução A
- 4,0 mL de Solução B
- 2,0 mL de Solução C
- Completa para 200 mL de água destilada autoclavada

Solução A

- 50 mL de Hipoclorito de Sódio (NaOCl 5%)
- 50 mL de água destilada autoclavada

Solução B

- 160 mL de KH₂PO₄ 1M
- 40 mL de HCl concentrado
- 250 mL de água destilada autoclavada

Solução C

- 500 µL de Tween 80 a 1%
- 50 mL de água destilada autoclavada

CORANTE IV

- 0,125 mg de azul de bromofenol
- 20 g de sacarose
- Dissolve em água ultra pura para um volume final de 50 mL

MEIO DE CULTURA MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

Sol.	Composto	g 100 mL⁻¹	mL L⁻¹ de meio
A	NH ₄ NO ₃ *	16,50	10
B	KNO ₃ *	19,00	10
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	10
D	KH ₂ PO ₄	1,7	10
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7	10
Sol.	Composto	g L⁻¹	mL L⁻¹ de meio
F	Na ₂ EDTA	3,360	10
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,780	
G	MnSO ₄ .H ₂ O	3,380	5
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,720	
	H ₃ BO ₃	1,240	
	KI	0,166	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,050	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	
VI	Tiamina	0,02	5
TA	Piridoxina	0,1	
MI	Ac. Nicotínico	0,1	
NAS	Glicina	0,4	
	Inositol	20	
SACAROSE		30	

*Nutrientes suprimidos (sem adição de N).