

Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros

Manoel Araújo Teixeira⁽¹⁾, Itamar Soares de Melo⁽²⁾, Rosana Faria Vieira⁽²⁾,
Francisco Eduardo Carvalho Costa⁽¹⁾ e Ricardo Harakava⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade do Vale do Sapucaí, Av. Prefeito Tuany Toledo, 470, Caixa Postal 213, CEP 37550-000 Pouso Alegre, MG. E-mail: manoel.at@uol.com.br, costafec@uol.com.br ⁽²⁾Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna, SP. E-mail: melo@cnpm.br, rosana@cnpm.br ⁽³⁾Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, CEP 04014-002 São Paulo, SP. E-mail: harakava@biologico.sp.gov.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de microrganismos endofíticos, em plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletadas de áreas comerciais, no Estado de São Paulo, e de etnovarietades dos estados do Amazonas e Bahia e, também, avaliar seu potencial para fixar N atmosférico e para produzir ácido indolacético. Nos três estados, foram identificadas 47 espécies de microrganismos pertencentes a 27 gêneros. *Bacillus* spp. foi o mais freqüente em todas as regiões. O maior número de gêneros foi encontrado em plantas provenientes do Estado do Amazonas, que apresenta a maior diversidade de microrganismos endofíticos. Amplificações por PCR do gene *nifH* foram avaliadas em espécies bacterianas pertencentes à γ -Proteobacteria. Isolados AIA positivos foram obtidos de material coletado em todos os estados, e foram representados por microrganismos pertencentes aos subgrupos γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria, Bacilli e Actinobacteria. A ocorrência de bactérias endofíticas em plantas de mandioca, com capacidade para fixar N atmosférico e produzir AIA in vitro, indica potencial para promover o crescimento da planta.

Termos para indexação: *Manihot esculenta*, *Bacillus*, Actinobacteria, fixação de nitrogênio, ácido indolacético.

Cassava endophytic microorganisms of commercial plantings and ethnovarieties in three Brazilian states

Abstract – The aim of this work was to perform a survey of the diversity of endophytic microorganisms in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) collected from commercial plantings, in the State of São Paulo, and in ethnovarieties collected in the States of Amazonas and Bahia, and also, to evaluate its potential of biological nitrogen fixation, and to produce indolacetic acid. In those States, 47 species of 27 genera were identified. *Bacillus* spp. was the most frequently found in all sampled regions. In Amazonas State, it was found the higher diversity of endophytic microorganisms. PCR amplifications of the *nifH* gene were evaluated in species of γ -Proteobacteria subgroup. IAA production was found in microorganisms isolated in cassava grown in all sampled States and belonged to the following subgroups: γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria, Bacilli and Actinobacteria. In cassava, the occurrence of endophytic bacteria, with N-fixing and in vitro IAA-producing abilities, indicates potential for plant growth promotion.

Index terms: *Manihot esculenta*, *Bacillus*, Actinobacteria, nitrogen fixation, indol-acetic acid.

Introdução

Os microrganismos associados às plantas são considerados endofíticos, quando habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Hallmann et al., 1997). Eles ocorrem em muitas, senão em todas as plantas cultiváveis, e sua diversidade tem sido amplamente relatada nos últimos anos. Os gêneros mais comumente isolados incluem: *Bacillus*,

Burkholderia, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Hallmann et al., 1997). Araújo et al. (2002) encontraram cerca de dez gêneros de microrganismos endofíticos associados a plantas de citros. *Pantoea agglomerans* e *Sphingomonas sanguinis* foram isoladas como endofíticos em batata-doce (Adachi et al., 2002). Zinniel et al. (2002) identificaram, pela primeira vez, a natureza endofítica da *Microbacterium testaceum* em várias plantas hospedeiras.

Vários são os exemplos da aplicação de microrganismos endofíticos na produção agrícola: aumento na produção por meio da produção de fitormônios; promoção do desenvolvimento e da proliferação das raízes (Mehnaz et al., 2001); maior resistência das plantas a doenças (Chen et al., 1995); contribuição no manejo de pragas e doenças (Fahey et al., 1991); fixação do nitrogênio; e maior resistência das plantas a condições de estresse (Bensalim et al., 1998).

O suprimento adicional de N para as plantas, pelos endófitos diazotróficos, é a forma direta que estes microrganismos utilizam para promover o crescimento de diferentes culturas. A presença do gene *nifH*, que codifica a unidade Fe-nitrogenase do complexo nitrogenase, tem se tornado um marcador muito utilizado no estudo da diversidade de endofíticos com potencial para fixar N₂, em estudos independentes de cultivo (Izquierdo & Nüsslein, 2006). Do mesmo modo, ênfase tem sido dada à seleção de microrganismos com capacidade para produção de hormônios de crescimento, como o ácido indolacético, em decorrência do efeito regulador positivo que estes organismos podem ter no desenvolvimento das plantas (El-Khawas & Adachi, 1999)

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento da diversidade de microrganismos endofíticos, em plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletadas de áreas comerciais no Estado de São Paulo, e de etnovarietades dos estados do Amazonas e Bahia e, também, avaliar seu potencial para fixar N atmosférico e a capacidade de produzir ácido indolacético.

Material e Métodos

Foram coletadas variedades comerciais de mandioca, no Estado de São Paulo, e etnovarietades mantidas por pequenos agricultores e tribos indígenas nos Estados do Amazonas e Bahia. No Estado de São Paulo, as coletas foram realizadas em áreas importantes na produção da mandioca, como Mogi-Guaçu (22°17'11"S, 47°06'46"W), Araras (22°25'14"S, 47°15'52"W) e Iêpe (22°39'09"S, 51°03'24"W). As variedades de mandioca coletadas foram IAC 12.829 e IAC 576-70.

No Estado da Bahia, as plantas foram coletadas no Parque Nacional Monte Pascoal, em Porto Seguro, em: Aldeia Boca da Mata (16°50'40"S, 39°20'39"W), Aldeia Barra Velha (16°51'29"S, 39°10'28"W) e Aldeia Imbiriba (16°39'30"S, 39°09'01"W). As variedades coletadas são popularmente denominadas pelos agricultores locais de Bravo, Caixão, Colombo, Cacau, Roxo, Lafaiete, Pretinha, Unha e Branca.

As coletas no Estado do Amazonas foram realizadas na região de Manacapuru, em quatro pontos diferentes. Nos três estados, de cada local amostrado, foram retiradas quatro plantas.

As raízes, caules e folhas foram tratados segundo método descrito por Araújo et al. (2002), modificado, com: álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (6 min), álcool 70% (30 s) e água destilada.

Para se ter certeza de que apenas microrganismos endofíticos foram isolados, a última água de lavagem foi distribuída sobre os meios de cultura utilizados e as placas incubadas. Do material desinfestado foram retiradas as extremidades, e o restante foi cortado em pequenos pedaços (0,5–0,7 cm), que foram distribuídos na superfície dos meios de cultura Tryptone Soya Agar (TSA) (Araújo et al., 2002) e amido caseína (amido, 10 g; caseína, 0,3 g; KNO₃, 2 g; NaCl, 2 g; K₂HPO₄, 2 g; MgSO₄.7H₂O, 0,05 g; FeSO₄.7H₂O, 0,01 g; ágar, 16 g). Ambos os meios de cultura foram suplementados com 1.000 µL mL⁻¹ de fungicida benomil.

Para cada parte da planta (raiz, caule e folha) e para cada planta foram feitas três placas de cada meio de cultura, cada uma com sete pedaços de tecido vegetal. As placas foram mantidas em sala, com temperatura ambiente entre 25 e 27°C.

A avaliação do crescimento microbiano teve início após 48 horas de incubação e prosseguiu por um período de dez dias. Depois do crescimento, os microrganismos foram transferidos para outras placas com o mesmo meio de cultura. Colônias individuais foram purificadas por esgotamento e conservadas em óleo mineral. Para se evitar o excesso de microrganismos, os isolados foram primeiramente agrupados, segundo algumas características macroscópicas e microscópicas das colônias, e submetidos à identificação pela análise do perfil de ácidos graxos (Sasser, 2001). A frequência das espécies de organismos endofíticos isolados foi calculada, tendo-se considerado o número total de microrganismos que foram submetidos à identificação dentro de cada estado.

Extração do DNA genômico total

Os isolados bacterianos foram cultivados em 10 mL de meio de cultura TSA líquido e incubados por 48 horas a 28°C, em agitador a 120 g. Depois desse período, as suspensões bacterianas foram recolhidas em tubos de 1,5 mL e centrifugadas por 15 min a 13.000 g; o sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de TE (Tris-HCl 1M pH 7,5, 10 mL; EDTA 0,5M pH 8, 2 mL;

água destilada, 1.000 mL) e centrifugado (15 min a 13.000 g). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspenso em 500 µL de TE, aos quais foram adicionados 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica.

O material foi agitado em “bead beating” (Biospec Products) por 30 s, para lise da parede celular. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com isopropanol e NaCl (5 M). A lavagem do DNA foi realizada com etanol 70%, que foi descartado. O DNA foi colocado para secar a 37°C. Após a ressusensão do material, em 50 mL de água Milli-Q, ele foi estocado a -20°C. Todas as amostras foram tratadas com RNase (10 mg mL⁻¹).

Amplificação por PCR dos genes *nifH*

As reações de amplificação por PCR foram feitas conforme descritas por Ueda et al. (1995), tendo-se utilizado o primer universal 19f 5'GCINTYTAYGGIAARGGIGG3' e 407r 5'AAICCRCCRCAIACIACRTC3', para os isolados pertencentes aos grupos das Proteobacteria e Actinobacteria. Para o grupo Bacilli, as reações de amplificação foram descritas por Achouak et al. (1999), e o primer específico utilizado foi f 5'-GGAATTCTGTGATCCTAAAGCTGA-3' e r 5'-AGCATAATTGCCATCATTTCACC-3'. Foram utilizados 5 µL da reação de PCR para a observação em gel de agarose (1,2%). Fragmentos de aproximadamente 370 pb foram esperados para o gene *nifH*.

Seleção de microrganismos produtores de ácido indolacético

A seleção de microrganismos produtores de ácido indolacético foi realizada com a técnica qualitativa (Bric et al., 1991). Como controle positivo foi utilizada a *Gluconacetobacter diazotrophicus* Br11281.

Resultados e Discussão

Foram isolados 482 microrganismos endofíticos das plantas de mandioca. Deste total, 137 foram submetidos à identificação: 45 provenientes do Estado do Amazonas, 46 do Estado de São Paulo e 46 do Estado da Bahia. Estes números foram obtidos após o agrupamento do total de microrganismos endofíticos, tendo-se considerado as características macroscópicas e microscópicas das colônias.

Nos três estados, foram identificadas 47 espécies de microrganismos pertencentes a 27 gêneros (Tabela 1), e os mais freqüentemente isolados foram: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Stenotrophomonas* e *Serratia*. Estes gêneros representaram aproximadamente 71% dos isolados identificados.

As plantas de mandioca coletadas no Estado do Amazonas foram as que apresentaram maior diversidade de microrganismos endofíticos, com 19 dos 27 gêneros

Tabela 1. Freqüência (%) de ocorrência de microrganismos endofíticos, obtidos de plantas de mandioca provenientes de diferentes Estados brasileiros.

Microrganismo endofítico	Estado de origem		
	São Paulo	Amazonas	Bahia
<i>Acidovorax avenae</i>	-	2,27	-
<i>Acinetobacter</i> sp.	2,20	-	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2,20	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	6,50	13,35	15,22
<i>Bacillus anthracis</i>	2,10	4,46	-
<i>Bacillus megaterium</i>	10,60	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	8,60	2,24	21,74
<i>Bacillus lentimorbus</i>	2,10	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	15,10	4,46	-
<i>Bacillus subtilis</i>	10,60	-	-
<i>Bacillus atrophaeus</i>	-	-	2,17
<i>Bacillus sphaericus</i>	2,10	-	-
<i>Brachy bacterium paraconglomeratum</i>	-	2,27	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-	2,27	-
<i>Brevibacillus brevis</i>	-	2,27	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	-	6,80	-
<i>Clavibacter michiganensis</i>	-	2,27	-
<i>Curtobacterium luteum</i>	-	2,27	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,23	2,25	2,17
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2,23	2,25	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	4,46	2,17
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	-	6,52
<i>Enterobacter hormaechei</i>	6,58	-	6,52
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2,23	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	2,23	-	-
<i>Escherichia coli</i>	2,20	6,80	-
<i>Flavimonas oryzae</i>	2,20	-	-
<i>Gammaproteobacterium</i>	2,20	-	2,10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	2,27	4,30
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	-	2,27	-
<i>Microbacterium imperiale</i>	-	4,45	-
<i>Microbacterium aeroboscens</i>	-	2,25	-
<i>Microbacterium hominis</i>	-	2,25	-
<i>Microbacterium chocolatum</i>	-	-	2,10
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	2,27	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	-	4,30
<i>Pantoea ananatis</i>	2,20	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	6,52
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	-	2,27	-
<i>Rhizobium radiobacter</i>	4,40	-	2,10
<i>Salmonella bongori</i>	-	4,45	2,17
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	2,25	2,17
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	2,25	-
<i>Serratia marcescens</i>	4,40	-	2,10
<i>Serratia rubidae</i>	-	2,27	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4,40	6,80	10,80
<i>Streptomyces olivaceus</i>	-	2,27	-
<i>Variovorax paradoxus</i>	-	-	2,10
<i>Yersinia frederiksenii</i>	-	-	2,10

identificados. Na Bahia e em São Paulo, foram identificados 13 e 10 gêneros, respectivamente. No Estado da Bahia, à exceção dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Salmonella* e, em São Paulo, à exceção dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*, foi identificada apenas uma espécie de cada gênero. No Estado do Amazonas, foram encontradas mais de uma espécie dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium* e *Salmonella*.

O gênero *Bacillus* foi encontrado com maior frequência em todas as regiões amostradas. Nos Estados de São Paulo, Amazonas e Bahia, ele representou mais de 57, 24 e 39%, respectivamente, do total de microrganismos endofíticos identificados. Do total de isolados do gênero *Bacillus*, 60% pertenciam ao grupo *B. cereus* (que incluem as espécies *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*), 16,3% à espécie *B. pumilus* e 9% à espécie *B. megaterium*. Os outros 18,4% foram distribuídos entre as espécies *B. lentimorbus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus* e *B. atrophaeus*. A maior diversidade de espécies do gênero *Bacillus* foi encontrada no Estado de São Paulo (Tabela 1). Nos estados do Amazonas e Bahia, os isolados do grupo *B. cereus* foram responsáveis por 81,8 e 94,4%, respectivamente, das identificações em espécie do gênero *Bacillus*; em São Paulo este percentual caiu para 27%.

O gênero *Bacillus* foi relatado, em vários trabalhos, como a principal bactéria endofítica de determinadas plantas (Hallmann et al., 1997). Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são considerados agentes de biocontrole de doenças de plantas, o que demonstra o seu grande potencial para utilização na agricultura.

Um dado importante foi a identificação de *Bacillus thuringiensis* como bactéria endofítica de mandioca. Poucos relatos da literatura se referem à ocorrência desta espécie bacteriana como microrganismo endofítico. Esse microrganismo é conhecido por sua utilização em programas de controle biológico. No entanto, existe grande controvérsia entre técnicas que possam realmente diferenciar *B. cereus* de *B. thuringiensis*.

Depois do *Bacillus*, o gênero *Enterobacter* foi o que apresentou o maior número de espécies isoladas (Tabela 1). Somente *Enterobacter cloacae* foi encontrada em plantas oriundas dos três estados. Esta espécie é descrita como antagonista de *Pythium* sp., que causa podridão das raízes de pepino. Bactérias do gênero *Enterobacter* são também citadas como endofitos de outras culturas (Lacava et al., 2004).

O gênero *Burkholderia*, encontrado no Estado do Amazonas, é citado como endofito de várias espécies de *Citrus* (Araújo et al., 2001). O gênero *Pantoea*, encontrado somente no Estado de São Paulo, foi também detectado como endofito de plantas de citros (Araújo et al., 2002). Os gêneros *Acinetobacter* e *Serratia* são relatados como endofitos de *Citrus jambhiri* (Gardner et al., 1982) e de plantas de pepino (Liu et al., 1995), respectivamente. O gênero *Stenotrophomonas* foi encontrado como endofito de plantas de cana-de-açúcar e de plantas de trigo, e foi relacionado com o melhor crescimento de girassóis em estufa (Fages & Arsac, 1991). *Klebsiella pneumoniae* é um endofito comum de milho (Chelius & Triplett, 2000). O gênero *Salmonella* é citado como endofito em plantas de maçã, alface e alfafa (Dong et al., 2003). Hallmann et al. (1999) identificaram antagonistas microbianos pertencentes ao gênero *Microbacterium*, que diminuem a população de nematóides no solo.

Dentro dos diferentes grupos de microrganismos endofíticos que foram isolados da mandioca, destaca-se a diversidade de actinomicetos, encontrados no material proveniente do Estado do Amazonas, pertencentes a quatro famílias, ou seja, Micrococcineae, Streptomycetaceae, Dermabacteriaceae e Microbacteriaceae. A única espécie de actinomiceto, encontrada no material oriundo da Bahia, pertence à família Micrococcineae. Estes microrganismos apresentam grande potencialidade para propósitos biotecnológicos, bem como para usos farmacêuticos e de biocontrole. Apesar disso, os trabalhos relacionados com este tipo de microrganismo são escassos (Azevedo et al., 2000).

A maior diversidade de microrganismos endofíticos, encontrada no material obtido no Estado do Amazonas, em particular para os actinomicetos, pode estar relacionada tanto à variedade da planta quanto ao tipo de solo e à forma de cultivo da mandioca (Seghers et al., 2004).

Em São Paulo, a mandioca recebe grande quantidade de pesticidas e fertilizantes que podem influenciar a população de microrganismos do solo e, conseqüentemente, os endofitos. Na Bahia, embora não seja praticado um sistema de cultivo intensivo, a queimada é prática comum entre os pequenos agricultores.

Muitos autores têm comparado a comunidade bacteriana interna e externa de algumas plantas (Hallmann et al., 1997), e quase todas as bactérias

endofíticas também foram encontradas na rizosfera. Diversos fatores físicos e químicos do solo podem, portanto, ter sido os responsáveis pela diferença na diversidade de microrganismos encontrada no material oriundo dos três estados. São raros os trabalhos que relacionam a comunidade endofítica da planta com práticas agrícolas e tipos de solo. Recentemente, Conn & Franco (2004) mostraram que o tipo de solo afeta a população de actinomicetos endofíticos, isolados das raízes de trigo.

A amplificação por PCR do gene *nifH* somente foi observada em oito espécies bacterianas, pertencentes ao subgrupo das γ -Proteobacteria. Somente a espécie *Serratia rubidaea* apresentou uma banda bem visível (Figura 1); nos outros sete isolados, foi observada a presença de amplicons fracos, mas dentro do tamanho dos pares de base esperados.

Os isolados AIA positivos, obtidos de plantas provenientes da Bahia, foram representados por

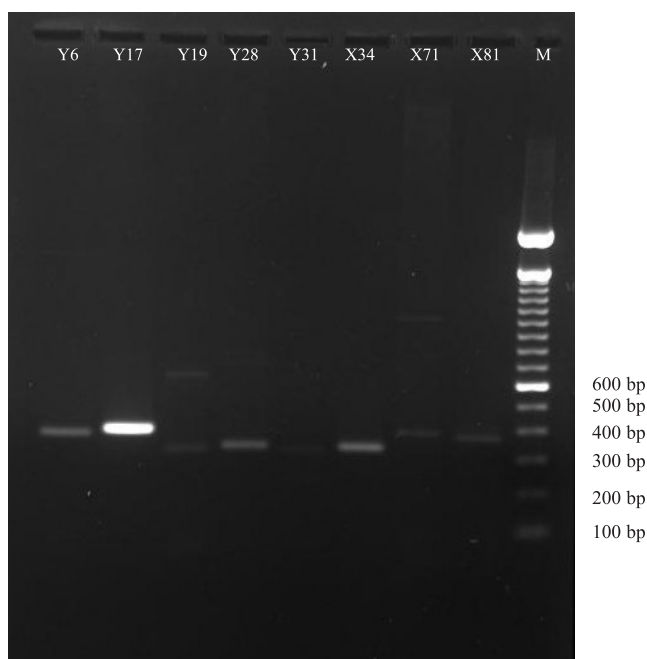


Figura 1. Amplificação do gene *nifH* de bactérias endofíticas de mandioca, cujas espécies correlacionam-se às identificações marcadas no gel. Y6: *Pseudomonas rhodesiae*; Y17: *Serratia rubidaea*; Y19: *Stenotrophomonas maltophilia*; Y28: *Enterobacter cancerogenus*; Y31: *Pseudomonas fluorescens*; X34: *Klebsiella pneumoniae*; X71: *Enterobacter agglomerans*; X81: *Enterobacter hormaechei*; M: Marcador 100 pb.

espécies de microrganismos pertencentes aos subgrupos γ -Proteobacteria, Bacilli e Actinobacteria. De plantas provenientes do Estado de São Paulo, foram obtidos isolados AIA positivos pertencentes aos subgrupos γ -Proteobacteria e Bacilli. Dos isolados obtidos de plantas oriundas do Amazonas, apenas a β -Proteobacteria *Burkholderia cepacia* foi AIA positiva (Tabela 2). Algumas espécies bacterianas (*Enterobacter cancerogenus*, isolado de planta proveniente de São Paulo; *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas fluorescens*, isolados de plantas provenientes do Estado da Bahia) apresentaram capacidade para produção de hormônio de crescimento e para fixação de N atmosférico, constatado pela presença do gene *nifH*.

O baixo número de bactérias com reações de PCR positivas para o gene *nifH* pode ser decorrente do fato de os isolados possuírem seqüências diferentes daquelas amplificadas pelos primers utilizados neste trabalho.

A presença de bactérias endofíticas diazotróficas, na cultura da mandioca, já havia sido constatada por Balota et al. (1999). Estes autores relataram, como também verificado neste trabalho, a diazotrofia da bactéria do gênero *Klebsiella*. Não existe relato sobre a ocorrência do gênero *Stenotrophomonas* como diazotrófico na cultura da mandioca ou em qualquer outra espécie de planta. A diazotrofia do gênero *Serratia* é raramente demonstrada na literatura. O primeiro relato deste gênero como um diazotrófico endofítico foi feito para a espécie *S. rubidaea*, isolada da endo-rizosfera de trigo (*Triticum aestivum*) e de *Ammophila arenaria*

Tabela 2. Espécies de microrganismos endofíticos, com capacidade para produção de ácido indolacético, isoladas de plantas de mandioca provenientes dos Estados do Amazonas, Bahia e São Paulo.

Subgrupo	Espécie	Procedência
Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bahia
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Bahia
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bahia
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	São Paulo
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bahia
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bahia
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	São Paulo e Bahia
Bacilli	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bahia
	<i>Bacillus cereus</i>	Bahia
	<i>Bacillus pumilus</i>	São Paulo
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Bahia
Actinobacteria	<i>Microbacterium chocolatum</i>	Bahia
β -Proteobacteria	<i>Burkholderia cepacia</i>	Amazonas

(Ruppel, 1988). Posteriormente, Gyaneshwar et al. (2001) isolaram a espécie *S. marcescens* como diazotrófico endofítico em arroz. Várias estirpes classificadas como *Pseudomonas* spp. foram também relatadas como diazotróficas (Desnoues et al., 2003). O gênero *Enterobacter* foi citado como diazotrófico em diferentes plantas (Balota et al., 1999; Mehnaz et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais os microrganismos endofíticos podem aumentar o crescimento das plantas são, ainda, obscuros. A utilização de bactérias produtoras de AIA ou com potencial para fixação de N atmosférico é uma forma inicial de seleção dos endófitos, uma vez que tais características exigem condições adequadas para se expressarem.

Silveira et al. (2004) verificaram que as espécies *Enterobacter cloacae*, estirpe PEP91, e *Bacillus amyloliquefaciens*, estirpe PEP81, aumentaram o crescimento de mudas de pepino, embora elas não fossem capazes de produzir ácido indolacético (AIA), ácido cianídrico (HCN) ou solubilizar fosfato em meio de cultura.

Gyaneshwar et al. (2001) relataram que a bactéria diazotrófica *Serratia marcescens*, ao ser inoculada na cultura do arroz, não mostrou atividade de redução do acetileno, nem aumentou os teores de N na planta, e o maior crescimento das plantas que receberam inoculação desta bactéria foi, provavelmente, associado a outros mecanismos, que não incluíram a fixação do N atmosférico. Thakuria et al. (2004) relataram que a bactéria, denominada pelos autores de P4, aumentou o rendimento de arroz, embora apresentasse baixa capacidade para solubilizar fosfato, não produziu AIA em meio de cultura e não demonstrasse atividade da nitrogenase na rizosfera. Segundo os autores a capacidade desta bactéria para solubilizar fosfato poderia ter sido aumentada, em condições de campo, na presença de uma comunidade microbiana complexa.

As interações solo-planta-microrganismos são complexas e seus efeitos individuais são difíceis de ser estudados. As bactérias observadas neste trabalho, nas condições em que elas foram isoladas, podem representar um componente importante no crescimento da mandioca. Em razão do pouco conhecimento dos processos interativos entre os microrganismos endofíticos e o ambiente que colonizam, na condução dos testes *in planta* com estes microrganismos, deve ser considerado o maior número possível de fatores

ligados à planta (condições de sanidade, estado nutricional), ao solo (fatores físicos, químicos, microbiológicos) e às condições climáticas (ocorrência de chuvas, solos bem drenados).

Conclusões

1. Etnovariedades de mandioca provenientes do Estado do Amazonas abrigam maior diversidade de microrganismos endofíticos do que plantas oriundas dos Estados da Bahia e de São Paulo.

2. O gênero *Bacillus* é o endófito predominante na mandioca tanto em etnovariedades quanto em plantas cultivadas para fins comerciais.

3. Ocorrem microrganismos endofíticos em plantas de mandioca, com capacidade para fixar nitrogênio atmosférico e produzir AIA *in vitro*.

Referências

- ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *Bacillaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.961-967, 1999.
- ADACHI, K.; NAKATANI, M.; MOCHIDA, H. Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.48, p.889-895, 2002.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J.D. van; VUURDE, J.W.L. van; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65, 2000.
- BALOTA, R.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1265-1276, 1999.
- BENSALIM, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S.K. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. **American Journal of Potato Research**, v.75, p.145-152, 1998.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. Rapid *in situ* assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.535-538, 1991.

- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.783-787, 2000.
- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v.5, p.83-91, 1995.
- CONN, V.M.; FRANCO, C.M.M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1787-1794, 2004.
- DESNOUES, N.; LIN, M.; GUO, X.; MA, L.; CARREÑO-LOPEZ, R.; ELMERICH, C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. **Microbiology**, v.149, p.2251-2262, 2003.
- DONG, Y.; INIGUEZ, A.L.; AHMER, B.M.M.; TRIPLETT, E.W. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1783-1790, 2003.
- EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, v.28, p.377-381, 1999.
- FAGES, J.; ARSAC, J.F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.137, p.87-90, 1991.
- FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.R.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARISON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. London: Springer-Verlag, 1991. p.401-411.
- GARDNER, J.M.; FELDMAN, A.W.; ZABLOTOWICZ, M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1335-1342, 1982.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; NATARAJAN, M.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- HALLMANN, J.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.551-560, 1999.
- IZQUIERDO, J.A.; NÜSSLEIN, K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. **Microbial Ecology**, v.51, p.441-452, 2006.
- LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.55-59, 2004.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995.
- MEHNAZ, S.; MERZA, M.S.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; BANO, A.; MALIK, K.A. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.110-117, 2001.
- RUPPEL, S. Isolation and characterization of dinitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of *Triticum aestivum* e *Ammophila arenaria*. **Developments in Soil Science**, v.18, p.253-262, 1988.
- SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Newark: MIDI Inc., 2001. 6p. (Technical note, 101).
- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1475-1482, 2004.
- SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.217-221, 2004.
- THAKURIA, D.; TALUKDAR, N.C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R.C.; KHAN, M.R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v.86, p.978-985, 2004.
- UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.1414-1417, 1995.
- ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, N.; HARRIS, B.; FENG, Z.; KUEZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208, 2002.

Recebido em 27 de março de 2006 e aprovado em 28 de setembro de 2006