

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE
RAÍZES DE MILHO (*Zea mays* L.) E POTENCIAL
PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO**

MÁRCIA MACIEL CERIGIOLI

SÃO CARLOS-SP
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE
RAÍZES DE MILHO (*Zea mays* L.) E POTENCIAL
PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO**

MÁRCIA MACIEL CERIGIOLI

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS-SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C415db

Cerigioli, Márcia Maciel.

Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento / Márcia Maciel Cerigioli. -- São Carlos : UFSCar, 2005.
132 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Microbiologia. 2. Microbiologia endofítica. 3. Milho. 4. Bactérias. 5. Ácido indol-acético. 6. nitrogênio – fixação. I. Título.

CDD: 576 (20^a)

Prof. Dr. Itamar Soares de Melo
Orientador

Aos meus pais **Tereza** e **Olidio** pela base
e cuidados para a minha formação
Ao meu irmão **Marcelo** pela amizade e amor

OFEREÇO

A **Marcos Rodrigues Costa**,
Pela paciência, dedicação e apoio durante a
realização deste trabalho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, pela amizade, orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução (UFSCar) pelo auxílio na realização deste trabalho.

A EMBRAPA/CNPMA pela disposição de suas dependências e auxílios para a execução deste trabalho.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio ambiente pela amizade, pelo constante apoio e ensinamento profissional.

Aos técnicos do “Campos Experimentais” da Embrapa pelo ensinamento profissional e ajuda, e aos demais funcionários pelo apoio técnico durante os experimentos em casa de vegetação.

Aos pesquisadores e estagiários do Laboratório de Microbiologia Ambiental, pela amizade e auxílio. Ao Alexandre Sereda pela ajuda neste trabalho.

A Dra. Célia M. M. de Souza Silva, Andréa Spessoto, Francisco E. Carvalho Costa, Rosely dos Santos Nascimento, Waldemore Moriconi e Manoel Teixeira pela amizade, ensino profissional e ajuda neste trabalho.

A Maria Amélia T. Leme, pela revisão realizada nesta tese

Ao Dr Wellington Araújo, e ao Dr. Gilson Manfio pelo apoio no desenvolvimento desta tese.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Dendograma baseado na composição de ácidos graxos das espécies de *Pseudomonas*, Subdivisão γ -*Proteobactéria*, Família *Pseudomonadaceae*, isoladas das quatro localidades amostradas..... 46
- Figura 2** – Dendograma baseado na composição de ácidos graxos do gênero *Enterobacter* Subdivisão γ -*Proteobactéria*, Família *Enterobacteriaceae*, espécies isoladas das quatro localidades amostradas. 46
- Figura 3** - Dendograma baseado na composição de ácidos graxos das espécies de *Bacillus*, Subdivisão *Firmicutes*, Família *Bacillaceae*, isoladas das quatro localidades amostradas..... 47
- Figura 4** - Dendograma baseado na composição de ácidos graxos da espécie *Ochrobactrum anthropi* Subdivisão α -*Proteobacteria*, Família *Brucellaceae* isolada de três das localidades amostradas..... 47
- Figura 5** - Dendograma baseado na composição de ácidos graxos da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, Subdivisão γ -*Proteobactéria*, Família *Xanthomonadaceae* isolada de três das localidades amostradas..... 48
- Figura 6** – Crescimento bacteriano em meio de cultura NFb livre de N₂, a fixação de nitrogênio é indicada pela cor azul. Amostra 1-Controle; 2-9R1/A; 3-8R2/C2; 4-8R9/B; 5-9R1/B; 6-19R1A com crescimento apenas na superfície..... 66
- Figura 7** – Porcentagem de isolados endofíticos de raízes de milho com capacidade de fixação de nitrogênio 67
- Figura 8** - Porcentagem de isolados endofíticos de raízes de milho com a presença do gene *nif H* 71

Figura 9 - PCR específico para o gene <i>nif</i> H. M marcador 100 pb; 1,2,3,4,5,isolados endofíticos.....	75
Figura 10 - Seleção da capacidade de produção de AIA por bactérias	77
Figura 11 - Quantificação de AIA utilizando o reagente de salkowski: diferentes tons de rosa na quantificação de AIA. O tom rosa escuro evidencia a maior concentração de AIA. Amostra 1 -16R3 ; 2 – 12R3/B2.....	77
Figura 12 - Porcentagem de gêneros bacterianos endofíticos de raízes de milho produtores de AIA mais representativos	78
Figura 13 - Curva da produção de AIA de bactérias endofíticas de raízes de milho de diferentes localidades	82
Figura 14 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (experimento I)	92
Figura 15 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (experimento I).....	92
Figura 16 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (Experimento II).....	94
Figura 17 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (experimento II).....	94
Figura 18 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo sob diferentes condições de tratamento (experimento III).....	96
Figura 19 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solos sob diferentes condições (experimento III).....	96

Figura 20 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo com Zn+NPK (experimento IV).....	99
Figura 21 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo com Zn+NPK (experimento IV).....	99
Figura 22 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas (experimento V)	101
Figura 23 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas (experimento V).....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias endofíticas diazotróficas de diferentes hospedeiros	17
Tabela 2 – Híbridos e tratamentos culturais das plantas de milho coletadas	29
Tabela 3 - Locais de coleta no Estado de São Paulo, tipo de microrganismo e número de bactérias isoladas em cada parte da planta de milho....	33
Tabela 4 - Filiação taxonômica das bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho em quatro localidades no Estado de São Paulo.....	35
Tabela 5 - Espécies bacterianas endofíticas de raízes de milho isoladas de plantas de Lins, identificadas através dos ácidos graxos	37
Tabela 6 - Espécies bacterianas endofíticas de raízes de milho isoladas de plantas de Santo Antonio da Posse, Ouroeste e Salto Grande, identificadas através dos ácidos graxos	38
Tabela 7 - Gêneros de bactérias isolados de milho em diferentes localidades no Estado de São Paulo	39
Tabela 8 - Espécies encontradas nas quatro localidades amostradas pertencentes a um mesmo gênero	39
..	
Tabela 9 - “Primers” utilizados para a detecção dos genes <i>nif</i> em bactérias endofíticas de raízes de milho	59
Tabela 10 - Resultados do crescimento no meio NFb de bactérias endofíticas de raízes de milho (<i>Zea mays</i>)	68
Tabela 11 -. Linhagens bacterianas endofíticas de raízes de milho provenientes de quatro localidades do Estado de São Paulo com a presença do gene <i>nif</i> H	72
Tabela 12 - Linhagens bacterianas endofíticas de raízes de milho produtoras de AIA	79
Tabela 13 -. Bactérias endofíticas capazes de solubilizar fosfato.....	84
Tabela 14 - Linhagens endofíticas de milho (<i>Zea mays</i>) que apresentaram positividade para um ou mais dos testes realizados, porcentagem de similaridade obtida na identificação pelo MIDI e local de isolamento	85

RESUMO GERAL

Devido ao emprego sempre crescente da quantidade de fertilizantes nitrogenados e fosfatados necessários à produção agrícola, a alta exigência energética para a produção dos fertilizantes, e ao impacto ambiental provocado pela lixiviação destes produtos, torna-se muito importante estender o processo de fixação biológica de nitrogênio a plantas não leguminosas, bem como a utilização de fosfato inorgânico de reservas do solo, disponível através da solubilização pelas bactérias, para as plantas de forma geral. Além disso, é importante o entendimento da interação bactéria-planta na produção da auxina AIA, bem como o conhecimento da diversidade das bactérias endofíticas para sua utilização no aumento da produção agrícola, pois vários fatores interagem nesta interação.

Assim, este trabalho teve como objetivos estudar a diversidade de bactérias endofíticas na cultura do milho (*Zea mays*), selecionar linhagens com potencial para a promoção de crescimento e testar a atividade na planta. A diversidade foi avaliada em plantas coletadas em quatro localidades do Estado de São Paulo e a identificação das bactérias foi realizada pelo método de extração dos ácidos graxos (FAME). Foi isolado um grande número de bactérias e observou-se uma diferença na diversidade em relação às diferentes localidades. O grupo *Proteobacteria* prevaleceu nas comunidades bacterianas endofíticas sendo a subdivisão gama (γ) e a Família *Enterobacteriaceae* as mais freqüentes e com maior diversidade. Os gêneros mais freqüentes foram *Stenotrophomonas* e *Bacillus*. As populações endofíticas de milho isoladas das quatro localidades amostradas, apresentam características relacionadas à promoção de crescimento vegetal como, produção de AIA, capacidade de

fixação de nitrogênio e de solubilização de fosfato. As diferentes condições de cultivo, os genótipos, bem como de estádios fenológicos podem ter influenciado a diversidade e diversidade fisiológica observada. As bactérias endofíticas pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Microbacterium saperdae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas mucidolens* promoveram o aumento de peso de raiz e da parte aérea de plantas de milho, apresentando potencial para utilização.

ABSTRACT

Due to the ever-increasing amounts of nitrogenous and phosphates fertilizers which are used for crop production, the great energy need for the production of these, and to the environmental impact provoked by the lixiviate, it is becoming very important to try to extend biological nitrogen fixation to non-legume, as well as the use of the solubilization of inorganic phosphate of reservations of the soil for the bacterias turning it available the plants in general. It is also important the understanding of the interaction bacteria-plant in the production of the auxin IAA and your use in the increase of the crop production, besides the knowledge of the diversity of endophytic bacterias for a possible use of the same in several ways, due to your adaptation to the internal conditions of the plants.

This way, this work had as objectives to study the diversity of bacterias endofíticas in the culture of the corn (*Zea mays*) and to select endophytic with potential for the growth promotion and your activity in the plant. This work had as objectives study the diversity of endophytic bacterias in the culture of maize (*Zea mays*) and to select of their plant-growth promoting potential and activity in the plant. The diversity was evaluated in plants collected at four places of the State of São Paulo and the identification was performed by the fatty acids method extraction (FAME). A great number of bacterias was isolated where the difference can be observed in the diversity in relation to the places. The largest diversity of species was observed at the place of Lins. The group *Proteobacteria* prevailed in the endophytic bacterial communities being the γ -

subdivision and in the *Enterobacteriaceae* Family the most frequent and with larger diversity. The most frequent genus were *Stenotrophomonas* and *Bacillus*. The populations endophytic maize present characteristics related to the plant growth promotion as, production of IAA, nitrogen fixation, and to solubilize phosphate. The different cultivation conditions and genotypes, as well as of developmental stage they might have influenced the observed physiologic diversity. Endophytic bacterias belonging to the species *Klebsiella pneumoniae*, *Microbacterium saperdae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas mucidolens* promoted the increase of root weight and of the aerial part of maize plants, presenting to application potential.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 Microorganismos endofíticos e sua importância.....	03
2.2 Diversidade de bactérias endofíticas.....	06
2.3 Identificação pela análise dos ácidos graxos.....	10
2.4 A cultura do milho e sua importância econômica.....	11
2.5 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico.....	14
2.6 Produção do hormônio auxina	17
2.7 Solubilização de fosfato.....	19
2.8 Promoção de crescimento de plantas	21
3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE MILHO DE DIFERENTES LOCALIDADES DO ESTADO DE SÃO PAULO	25
RESUMO	25
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2.1 Locais de coleta e condições de cultivo.....	28
3.2.2 Isolamento e preservação de bactérias endofíticas.....	29
3.2.3 Identificação das bactérias.....	30
3.2.3.1 Extração dos ácidos graxos	31

3.2.3.2 Análise dos ácidos graxos	32
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.3.1 Isolamento de bactérias endofíticas.....	32
3.3.2 Identificação das bactérias.....	34
3.4 CONCLUSÕES	51
4 Promoção de Crescimento de Plantas de Milho por Bactérias Endofíticas	52
RESUMO	52
4.1 INTRODUÇÃO	54
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.2.1 Seleção de bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio ..57	
4.2.1.1 Capacidade de crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio	57
4.2.1.2 Seleção de bactérias que codificam o gene <i>nif</i> H.....	57
4.2.2 Seleção de bactérias produtoras de ácido Indol Acético (AIA).....	59
4.2.3 Quantificação do AIA produzido pelas bactérias.....	60
4.2.4 Seleção de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato.....	60
4.2.5 Promoção de crescimento de milho.....	60
4.2.5.1 Experimentos	64
4.2.5.2 Avaliação promoção de crescimento.....	64
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.3.1 Seleção de bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio...65	
4.3.1.1 Capacidade de crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio	65
4.3.1.2 Presença do gene <i>nif</i> H	70
4.3.2 Produção de ácido Indol-Acético	76
4.3.3 Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato.....	83

4.3.4 Promoção de crescimento de milho.....	90
5. CONCLUSÕES.....	106
6. CONCLUSÕES GERAIS	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
APÊNDICE	130

1 - INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam uma das fontes de recursos naturais de fácil manipulação, podendo ser utilizada para o entendimento da natureza de vários processos vitais e problemas relacionados à saúde, à produção de alimentos e à produção industrial, podendo ser estudados em ambientes naturais ou em laboratório. São parte importante dos ecossistemas, devido ao papel crucial na transformação de energia e a participação em processos biogeoquímicos.

Apesar da grande importância dos microrganismos, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos (diversidade de espécies) representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza. Dados derivados de estudos comparativos indicam que apenas uma pequena fração dos microrganismos presentes na natureza (<1%), é cultivada através do emprego de métodos microbiológicos convencionais (Rozsak e Colwell, 1987; Pace, 1997). Um grande número de fatores pode ser apontado para a dificuldade no cultivo de microrganismos em condições de laboratório, entre eles o pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a biologia de organismos presentes em diferentes amostras ambientais.

São considerados endófitos os microrganismos que vivem pelo menos um período de seu ciclo de vida no interior de uma planta, sem causar doença e podem ser isolados de tecidos desinfetados superficialmente. A distinção entre endófitos, epífitos (aqueles que vivem

na superfície das plantas) e fitopatógenos (que causam doenças as plantas) é puramente didática.

O estudo dos microrganismos endofíticos é de grande importância devido à falta de informações para a elucidação da base biológica das interações endófitos-plantas e, também por serem potencialmente vantajosos em diversos aspectos, tais como: controle de pragas; controle de fitopatógenos; produção de metabólitos de interesse farmacológico; promoção do crescimento vegetal; vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras; fixação biológica de nitrogênio; produção de produtos biológicos evitando e reduzindo o uso de agroquímicos.

O milho (*Zea mays*) é uma importante cultura tropical e constitui-se na principal fonte de calorias para milhões de pessoas no México, na América Central e América do Sul. Esse cereal tem uma grande importância econômica no Brasil, pois além de ser utilizado na alimentação humana é utilizado na alimentação animal e na indústria, sendo também produto de exportação.

O Estado de São Paulo está entre os estados que mais produzem o milho, na forma verde para consumo humano, e para consumo animal.

Os objetivos deste trabalho foram estudar a diversidade de bactérias endofíticas associadas à cultura de milho (*Zea mays*), coletadas em quatro localidades no estado de São Paulo, e avaliar o potencial destas bactérias para promoção do crescimento da planta.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos endofíticos e sua importância

Bary (1866), citado por Azevedo (1998), foi quem primeiro propôs uma possível distinção entre os endofíticos e os patógenos de plantas. Os endófitos incluem fungos e bactérias. São considerados endófitos os microrganismos que vivem pelo menos um período de seu ciclo de vida no interior de uma planta, sem causar doença e podem ser isolados de tecidos desinfetados superficialmente. A distinção entre endófitos, epífitas (aqueles que vivem na superfície das plantas) e patógenos (que causam doenças as plantas) é puramente didática. Há um gradiente que os separa e assim, é uma tarefa muito difícil colocar limites para separar cada categoria. Existem populações bacterianas que podem flutuar entre a colonização endofítica e epifítica (Hallmann, et al., 1997).

Embora eles tenham sido descritos a dois séculos, os microrganismos endofíticos somente receberam considerável atenção a partir dos anos 80, quando foi reconhecida sua capacidade de proteger as plantas contra patógenos e insetos (Jacobs et al., 1985; Misaghi e Donndelinger, 1990; Hallmann, et al., 1997; Azevedo, 2000).

Em geral, estes microrganismos penetram nas plantas por aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas, área de emergência de raízes laterais ou ferimentos. Uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos são as raízes, pelo fato de apresentarem ferimentos durante a emergência de raízes secundárias laterais. Outras

portas são as aberturas causadas por insetos e pela produção de enzimas que facilitam a sua penetração. As bactérias também podem penetrar de forma ativa através da degradação enzimática da parede celular da planta pelas enzimas celulolíticas e pectinolíticas (Hallmann, et al., 1997). Após a penetração, eles movimentam-se dentro da planta, atingindo os diversos órgãos e tecidos (Azevedo, 1998).

Entre os microrganismos endofíticos e as plantas hospedeiras, ocorrem interações específicas, que se refletem principalmente em nível fisiológico. Com relação às bactérias, estas interações dependem da atividade de muitos genes, tanto da bactéria quanto da planta (Quispel, 1988).

Alguns estudos demonstram que a especificidade entre o endófito e seu hospedeiro pode chegar ao nível de espécie (Leuchtmann e Clay, 1990; Sieber-Canavesi et al., 1991). A composição de tais espécies pode variar em relação à distribuição geográfica dos hospedeiros, à idade das plantas, às condições ecológicas e sazonais (Carroll e Carroll, 1978; Petrini et al., 1982; Petrini, 1991)

O estudo dos microrganismos endofíticos é de grande importância devido à falta de informações para a elucidação da base biológica das interações endofíticos-plantas, e também por serem potencialmente vantajosos em diversos aspectos, como: 1- controle biológico de pragas; 2- controle de fitopatógenos; 3- produção de metabólitos de interesse farmacológico; 4- promoção do crescimento vegetal; 5- vetores para a

introdução de genes em plantas hospedeiras; 6- fixação biológica de nitrogênio; 7- vantagens econômicas como a produção de produtos biológicos evitando o uso de produtos agroquímicos.

Vários casos de controle biológico natural de insetos através de endófitos têm sido relatados. Alguns fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e empregados no controle biológico na agricultura são encontrados como endofíticos, como é o caso de *Beauveria bassiana*, endófito de milho, protegendo-o do ataque de insetos (Bing & Lewis, 1993).

Os endófitos geneticamente modificados podem servir como vetores para a introdução de genes de resistência ou outros, em espécies de plantas economicamente importantes (Petrini, 1991). O primeiro exemplo deste tipo de aplicação ocorreu em milho inoculado com *Clavibacter xyli* subsp *cynodontis* endofítica, na qual foi introduzido o gene da endotoxina de *Bacillus thuringiensis* para o controle da broca do colmo (Tomasino et al., 1995).

A produção de certos compostos como os antibióticos e outros metabólitos pelos endófitos sugerem que eles podem controlar doenças de plantas (Azevedo, 1998), sendo, neste caso, denominados antagonistas. O fungo endofítico *Acremonium kilense* por exemplo, encontrado em tomateiros propicia maior proteção contra determinados patógenos, tais como o *Fusarium oxysporum* e *Clavibacter michiganense*. Outras bactérias endofíticas produzem fatores de

crescimento como o ácido indol-acético (IAA) (Fuentes-Ramirez, et al., 1993) e/ou metabólitos potencialmente úteis. O taxol, um diterpenóide largamente utilizado no tratamento do câncer mamário e de útero, é produzido pela planta *Taxus brevifolia*, entretanto, este taxol é também produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (Stierle et al., 1993).

O uso de pesticidas eleva o custo de produção, pois, quando aplicados sofrem ação dos fatores ambientais como a chuva, requerendo aplicações múltiplas, podendo provocar a poluição do ambiente. A aplicação de microrganismos endofíticos pode ser realizada em quantidades mínimas por área, uma vez que estes se multiplicam dentro da planta, estando protegidos do ambiente externo.

Estudos sobre a cana-de-açúcar demonstraram que endofíticos como *Acetobacter diazotrophicus* e outras bactérias geram um aumento de produção sem elevar custos com o emprego de insumos como adubos nitrogenados (Döbereiner, 1992), demonstrando que os endofíticos são essenciais para a boa fixação de N₂ e o uso do N-fixado, para a nutrição das plantas.

2.2 Diversidade de bactérias endofíticas

Os microrganismos geram, somente pela sua utilização em processos biotecnológicos, bilhões de dólares por ano, embora a

biodiversidade seja a base genética da biotecnologia para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e/ ou social, a preservação da diversidade microbiana é pouco considerada (Tamayo et al., 1997; Bull et al., 2000).

A constatação de bactérias endofíticas em tecidos de plantas saudáveis tem sido relatada para muitas espécies cultivadas, e em diferentes estágios de crescimento (Trevet e Hollis, 1948; Jacobs, 1985; Hinton & Bacon, 1995; McInroy & Kloepper, 1995; Palus et al., 1996; Sturz, 1995).

Os gêneros mais comumente isolados incluem: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Hallmann et al., 1997). Em plantas de citrus cultivadas no estado de São Paulo e Minas Gerais, Araújo et al, (2002) isolaram as seguintes espécies: *Alcaligenes* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Burkholderia cepacia*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp. (incluindo *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* e *M. zatmanii*), *Nocardia* sp, *Pantoea agglomerans*, *Streptomyces* sp. e *Xanthomonas campestris*. Zinniel et al. (2002) identificaram pela primeira vez a natureza endofítica da bactéria *Microbacterium testaceum* em várias plantas hospedeiras.

O número de espécies de bactérias endofíticas isoladas de uma determinada planta está diretamente associado à parte do hospedeiro que é utilizada no isolamento. Em *Trifolium pratense* L., 31 espécies de 14 gêneros diferentes foram recuperadas de dentro das folhas, raízes e

nódulos. A diversidade de gênero foi maior nos tecidos foliares, com predominância da espécie *Pantoea agglomerans*. Nas raízes predominou a espécie *Agrobacterium rhizogenes*. Nos nódulos o *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli e *R. loti* (Sturz et al., 1997). Mocali et al. (2003) verificaram que as flutuações na comunidade bacteriana endofítica foram influenciadas, além de outros fatores, pelo órgão examinado. A maioria dos isolados de *Pseudomonas* foi detectada nas raízes, enquanto que a maioria dos isolados de *Curtobacterium* foi isolada dos caules. Lambe et al. (1996) relataram que as populações bacterianas são maiores nas raízes diminuindo no caule e folhas. Elvira-Recuenco e Van Vuurde (2000) verificaram um aumento da população de endofíticos na parte baixa do caule em comparação com a porção superior do caule. Isto indica que as sementes e o solo são importantes fontes iniciais de endófitos bacterianos, como já relatados por Misaghi e Donndelinger (1990), McInroy e Kloepper (1995).

Diferenças nas flutuações populacionais de bactérias endofíticas têm sido associadas ao genótipo das plantas, às condições ambientais e aos seus locais de origem. Pillay e Nowak (1997) detectaram populações de endófitos significativamente maiores nas raízes e parte aérea das plantas cultivadas a 10°C, em relação às cultivadas a 30 °C. Gardner et al. (1982) observaram grande flutuação na população de endófitos em raízes de limoeiro coletadas em períodos diferentes do ano. Mocali et al. (2003) observaram que bactérias do grupo *Bacillus* e do gênero *Curtobacterium* foram mais freqüentes em raízes de olmo nos meses

mais quentes, enquanto *Pseudomonas* sp. foi mais isolada nos meses frios. Adams e Kloepper (1998) sugeriram que a colonização das plantas de algodão por bactérias endofíticas é afetada pelo genótipo da planta.

A evolução das metodologias de biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Resultados de estudos dependentes e independentes de isolamento e cultivo, baseados em amplificação e seqüenciamento de fragmentos dos genes de RNA 16S (rDNA 16 S), demonstram que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é ampla (Head & Saunders, 1998; Hunter-Cevera, 1998).

A aplicação destas metodologias no estudo da diversidade de bactérias tem permitido a descoberta de um número extenso de novas linhas evolutivas nesse grupo. Métodos independentes de cultivo tendem a completar os métodos baseados em isolamento e cultivo para a realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (Hugenholtz e Pace, 1996; Hugenholtz et al., 1998;).

Os benefícios científicos esperados a partir de um melhor entendimento sobre a diversidade microbiana são extensos. Entre eles estão a compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas. Neste aspecto, várias pesquisas têm explorado a

diversidade de bactérias associadas às plantas, obtendo-se novas informações para o conhecimento de mecanismos envolvidos na interação bactéria-planta.

2.3 Identificação pela análise dos ácidos graxos

Muitos métodos têm sido utilizados para identificação rápida e diferenciação de bactérias introduzidas ou isoladas da rizosfera, entretanto, um dos mais promissores e confiáveis métodos consiste na análise de diferenças qualitativas e quantitativas da composição de ácidos graxos da parede célula (Ndowora, et al., 1996).

A análise dos ácidos graxos para identificação tem sido utilizada extensivamente para caracterizar comunidades bacterianas de solos (Ritchie, et al., 2000).

Três fatores tornam tal técnica adequada para o uso na identificação bacteriana. São eles: a diversidade de estrutura nos ácidos graxos; o seu padrão característico dentro de um taxon e a sua estabilidade (em comparação com a perda e a aquisição de plasmídeo ou mutações).

Na literatura vários estudos utilizaram os ácidos graxos para identificação de bactérias associadas a plantas, tais como a diversidade taxonômica de *Pseudomonas* de raízes de canola em campo (Misko & Germida, 2002); bactérias isoladas de sementes, folhas e solo de beterraba (Thompson et al. 1993); de bactérias endofíticas de algodão e

milho (McInroy e Kloepper, 1995) e; *Acetobacter diazotrophicus* endofítica de colmo de cana-de-açúcar (Dong et al., 1995).

Ndowora et al. (1996) avaliaram a composição de ácidos graxos na distinção entre linhagens de *Streptomyces* patogênicos e antagônicos produtores de antibióticos, evidenciando o sucesso desta técnica.

2.4 A cultura do milho e sua importância econômica

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea da família *Poaceae*, da tribo Maydeae, do gênero *Zea*, que compreende cinco espécies, sendo uma delas a *Zea mays* (Borém, 1999).

O primeiro contato do homem europeu com o milho ocorreu por volta de 1492, por ocasião da colonização da América, entretanto, ele já era cultivado pelos seus habitantes desde o Canadá até a Argentina. Importantes civilizações americanas antigas como a dos astecas, maias e incas o domesticaram entre 7.000 e 8.000 anos atrás, tendo se tornado um dos principais cultivos (Borém, 1999).

O milho é a planta cultivada que atingiu o mais elevado estágio de domesticação, uma vez que perdeu a característica de sobrevivência sem a intervenção do homem. A espécie *Zea mays* L. é altamente politépica, com grande variabilidade genética (Borém, 1999). A grande diversidade genética encontrada nesta espécie, sem dúvida, pode ser considerada um exemplo de evolução, reconhecendo-se hoje cerca de 250 raças (Fornasier Filho, 1992).

As fases de desenvolvimento da planta do milho pode ser dividido em dois estádios: vegetativo e de granação. O estágio vegetativo acha-se sub-dividido em três fases: fase entre a semeadura e a emergência; fase entre a emergência e o pendoamento e fase entre o pendoamento e a polinização. O estágio de granação, por sua vez, compreende o período correspondente da fecundação à maturidade fisiológica (Fornasier Filho,1992). Gomes e Karazawa (1984) classificaram os estádios de 0 a 10.

Mundialmente, o milho ocupa, entre os cereais, o terceiro lugar em área semeada e em produção global. É utilizado na alimentação humana, animal e na indústria. O milho é um dos principais cereais cultivados no Brasil, representando 40 % do total dos grãos (Fornasier Filho,1992; Agriannual, 2004). No Estado de São Paulo, ocupa posição de destaque tanto em área cultivada, como em produção. As condições de clima, solo e topografia permitem o seu cultivo em, praticamente, todo o Estado (Fornasier Filho, 1992).

A safra de 2003/04 do Estado de São Paulo foi de 4,34 milhões de toneladas em 1.063.704 hectares de área colhida, sendo comparável, em produção, a Minas Gerais, ficando atrás apenas do Paraná. O Brasil produziu na safra 2003/04 aproximadamente 40 milhões de toneladas, sendo superado apenas pelos Estados Unidos e China. As exportações de milho do Brasil cresceram 30 % em 2004, para 4,8 milhões de toneladas, comparado com 3,7 milhões no ano anterior (Agriannual 2004).

O consumo mundial ficou em 637 milhões de toneladas e deverá crescer em torno de mais 22 % nos próximos dez anos, impulsionado principalmente pela transformação do cereal em etanol e pelo crescente uso de óleos vegetais nos combustíveis por diversos países, chegando a 767 milhões de toneladas (Agrianual 2004).

Os cereais possuem um alto requerimento de nitrogênio para uma ótima produção (Fornasier Filho, 1992). Portanto, dentre os fertilizantes usados na cultura do milho, o adubo nitrogenado é o que mais eleva o custo da adubação, chegando a representar cerca de 40 % do custo total de produção. Portanto, a fixação biológica é uma alternativa de relevante importância no suprimento do nitrogênio necessário a cultura.

As bactérias do gênero *Azospirillum* são freqüentemente encontradas habitando as raízes de gramíneas como o milho e o arroz. *Azospirillum lipoferum* parece infectar preferencialmente raízes de milho e *A. brasilense*, o trigo e o arroz. As respostas à inoculação de outras bactérias fixadoras de nitrogênio nestas gramíneas dependem do uso de estirpes competitivas que se estabeleçam e se multipliquem nas raízes, penetrando nas plantas e colonizando a parte aérea (Boddey et al., 1986).

McInroy e Kloepper (1991) verificaram que plantas saudáveis de milho contêm uma microflora bacteriana diversificada, sendo o número de gêneros isolados dos tecidos do caule e da raiz maior do que o encontrado na rizosfera dessas mesmas plantas.

A variação de resultados nos vários estudos reflete a influência dos diversos genótipos testados; das mais variadas formas de inoculação e; das mais diversas linhagens usadas. Estudos demonstraram que a viabilidade do uso de microrganismos benéficos e a seleção de linhagens mais eficientes são de grande importância para a redução do uso de adubos nitrogenados, principalmente na cultura de milho (Teixeira, 1997).

2.5 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico

O N_2 atmosférico é pouco reativo, somente algumas espécies de microrganismos procarióticos possuem o complexo enzimático, chamado nitrogenase, necessário para transformá-lo em amônia, que é subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas. Este processo é chamado fixação biológica de N_2 (FBN) (Neves e Rumjanek, 1998), a qual se constitui a principal via de entrada, suprimento e incremento de nitrogênio nos sistemas vivos.

A fixação biológica de N_2 é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes nif (“nitrogen fixation”), os quais codificam proteínas envolvidas diretamente neste processo.

A descoberta dos genes envolvidos na FBN foi proveniente do estudo da genética da fixação de nitrogênio em *Klebsiella pneumoniae*. Foram identificados 20 genes, organizados em 7-9 operons que ocupam, no genoma de *K. pneumoniae*, uma região de aproximadamente 24 Kb (1Kb = 1.000 pares de bases) no genoma desta bactéria (Teixeira, 1997).

Os genes *nif HDK* codificam as proteínas estruturais do complexo enzimático denominado nitrogenase. Esse processo é caracterizado pela presença de duas metalo-proteínas: a Fe-proteína e a MoFe-proteína. A Fe-proteína é codificada pelo gene *nif H*. Os genes *nif DK* codificam para a subunidade α e β da MoFe-proteína, que apresenta 2 grupamentos P e seu sítio ativo é composto por 2 cofatores de FeMo (Teixeira, 1997).

Dos 20 genes *nif* identificados em *K. pneumoniae*, 14 têm sido encontrados na maioria dos diazotróficos estudados. Em *Enterobacter agglomerans* diazotrófica de vida livre encontrada associada à rizosfera de diversos cereais, apesar de organização estrutural semelhante à observada para *Klebsiella pneumoniae*, foi observada a presença de genes *nif* na porção extracromossomal do genoma, indicando que tal característica não é única dos diazotrofos simbióticos (Teixeira, 1997).

Estudos diversos demonstraram a presença de genes *nif H* em microrganismos presentes em ambientes diversos: solos de florestas (Shaffer *et al*, 2000), rizosfera de solos cultivados com cereais como o arroz (Ueda *et al*, 1995) e ambientes aquáticos (Zehr *et al*, 1998).

A maioria dos solos das regiões tropicais é deficiente em N, causando graves limitações à produção de alimentos. Como somente os fertilizantes nitrogenados ou a FBN podem retornar o N aos solos agrícolas, a exploração da FBN, nos países desenvolvidos, tem sido motivada pela conscientização ecológica sobre o uso intensivo e, às vezes, abusivo de agroquímicos e, pela diminuição do custo da produção. Entretanto, sua utilização depende do profundo conhecimento

das bactérias diazotróficas, de suas relações com as plantas superiores e com os demais membros da microbiota do solo e da rizosfera (Neves & Rumjanek, 1998).

A produção de soja no Brasil é um exemplo da eficiência da FBN, pois, desde que foram realizados programas para o incremento da fixação de N₂, que resultaram no desenvolvimento de inoculantes com linhagens de *Rhizobium*, poucas aplicações de fertilizantes nitrogenados foram realizadas (Alves *et al.*, 2003)

Diversos trabalhos relataram a presença de bactérias endofíticas diazotróficas em diferentes hospedeiros (Tabela 1). Alguns deles reforçam a hipótese de que possa ocorrer expressão de genes envolvidos na fixação biológica de N₂ no interior de tecidos vegetais. Entre eles estão os de Egner *et al.* (1999), que relata a expressão do gene *nif H* de *Azoarcus* sp. no interior de raízes de arroz; e o de Chelius & Triplett (2000) que demonstrou a expressão em *Klebsiella pneumoniae*, no interior de raízes de milho.

Espécies de *Methylobacterium* com capacidade para fixar N₂ têm sido isoladas de citrus, soja e crotalária (Araújo, *et al.*, 2001; Sy *et al.*, 2001; Sobral, 2003;) . Sy *et al.* (2001) demonstraram a existência de um isolado deste gênero, que nodula e fixa nitrogênio em simbiose com legumes (Crotalaria). Outras espécies de *Methylobacterium* já foram isoladas de plantas como algodão, milho (McInroy e Kloepper, 1995) e cultivares selvagens e tradicionais de arroz (Elbeltagy *et al.*, 2000). A

Tabela 1 a seguir exemplifica algumas bactérias diazotróficas encontradas na literatura:

Tabela 1 - Bactérias endofíticas diazotróficas de diferentes hospedeiros

Hospedeiro	Espécies	Referências
Arroz	<i>Serratia marcescens</i>	Gyaneshwar et al., 2001
Cana-de-açúcar	<i>Acetobacter diazotrophicus</i> ; <i>Burkholderia</i> sp	Dong et al., 1995; Lee et al., 2000
<i>Crotalaria</i> spp	<i>Methylobacterium nodulans</i>	Sy et al., 2001
Milho	<i>Azospirillum lipoferum</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Baldani e Döbereiner, 1980; Chelius & Triplett, 2000

2.6 Produção do hormônio vegetal auxina

Em plantas, os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelina, etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham uma função na regulação do crescimento. No entanto, alguns hormônios possuem efeitos inibitórios, sendo mais adequado considerá-los como reguladores químicos. Além disso, um mesmo hormônio pode produzir respostas diferentes em tecidos ou em diferentes fases do desenvolvimento num mesmo tecido (Raven *et al.*, 2001).

A principal auxina de ocorrência natural é denominada ácido indolacético (AIA). Diversos microrganismos, como bactérias e fungos em solos e/ou associados às plantas, sintetizam hormônios de crescimento idênticos aos encontrados nas plantas, dentre eles o AIA. Em plantas, o AIA microbiano produzido por bactérias do gênero *Azospirillum*,

Alcaligenes faecalis, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* *Xanthomonas*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* sp tem sido relacionado ao estímulo de crescimento, e o produzido pelas espécies *Pseudomonas savastanoi*, *P. syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* às patogenias (Costacurta e Vanderleyden, 1995; Patten e Glick, 1996).

A produção de reguladores químicos vegetais é um mecanismo de interação bactéria-planta, sendo influenciado por vários fatores como o genótipo do hospedeiro e do próprio microrganismo (Jain e Patriquin, 1985). A produção de AIA que aparentemente não funciona como um hormônio em células bacterianas, pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta (Patten e Glick, 2002).

Há evidências de que um microrganismo pode selecionar uma rota em particular para a biosíntese de AIA, dentre as várias que possui, de acordo com o ambiente. Estas vias biossintéticas são classificadas segundo seus compostos intermediários, como IAM ou IPya (Patten & Glick, 1996; Dobbelaere et al. 1999). Vários estudos demonstraram que as bactérias benéficas produzem AIA via ácido indolpirúvico (IPya), já as patogênicas produzem este composto via ácido indolacetamida (IAM) (Patten & Glick, 1996; Manulis et al., 1998). Além disso, estudos relatam à existência de mais de uma rota para a síntese de AIA em muitas bactérias, sendo que a maioria delas é via triptofano (Patten e Glick, 1996).

Costacurta & Vanderleyden (1995) observaram que espécies de *Rhizobium* parecem utilizar a rota indoleacetamida somente quando estão associados às plantas. Contudo, em estado livre, produzem AIA via ácido indolpirúvico (Kaneshiro et al., 1983; Ernstesen et al., 1987).

A produção e a concentração de triptofano nos exsudados das raízes variam com as espécies de plantas (Patten & Glick, 1996). O milho (*Zea mays*) possui duas rotas de síntese de AIA com triptofano (Glawischnig et al., 2000) e sem triptofano (Michalczuk et al., 1992; Östin, et al., 1999).

A detecção de auxinas pode ser realizada quantitativamente por uma reação colorimétrica específica e sensível, utilizando-se o reagente de Salkowski ou por um método mais preciso, pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) (Ehmann, 1977; Crozier et al., 1988; Glickmann & Dessaux, 1995). Já a detecção qualitativa pode ser realizada em membrana de nitrocelulose, utilizando também o reagente de Salkowski (Bric et al., 1991).

2.7 Solubilização de fosfato

O fósforo é o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal, ficando atrás apenas do nitrogênio. O fósforo é importante para a planta, pois é o principal componente de combinações vitais como a lecitina, nucleotídeos, entre outras, estando relacionado aos fenômenos

de armazenamento e transferência de energia na planta, sob a forma de ATP (Fornasieri Filho, 1992).

A maior reserva de P são as rochas e outros depósitos, como as apatitas e outros minerais primários formados durante a era geológica (Rodríguez & Fraga, 1999). Ele é abundante nos solos na forma orgânica e inorgânica. Na forma orgânica, como componente de proteínas, aminoácidos e ácidos graxos, que para ser absorvido pelas plantas, necessita ser mineralizado (Fornasieri Filho, 1992; Rodríguez & Fraga, 1999).

Entretanto, apesar da abundância nos solos, forma compostos insolúveis com alumínio e ferro, bem como com a matéria orgânica, nos solos ácidos, enquanto nos solos alcalinos forma reserva solúvel quando ligado ao cálcio e magnésio. Portanto, devido a sua reatividade a quantidade total de P no solo pode ser alta, mas indisponível para a captação das plantas (López-Bucio et al., 2002).

Na forma solúvel, se apresenta em baixa concentração nos solos, em níveis de 1 ppm (H_2PO_4^-) ou menos. A maioria dos solos agrícolas contém grandes reservas de fósforo acumulado como consequência de aplicações regulares de fertilizantes. Contudo, uma grande porção é rapidamente imobilizada após a aplicação, pois dependendo do pH e tipo de solo, torna-se indisponível as plantas (Rodríguez & Fraga, 1999). Uma solução pode ser a utilização de processos microbiológicos para aproveitar o fosfato de rochas (Zapata e Amann, 1995). Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em

solubilizar compostos de fosfato inorgânico. Entre os gêneros com essa capacidade estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (Rodríguez e Fraga, 1999).

Portanto, a capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, pois esta característica apresenta um grande potencial para a promoção de crescimento vegetal. É interessante ressaltar que as bactérias endofíticas com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico ganham importância durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, provê-lo deste mineral essencial para o desenvolvimento vegetal.

2.8 Promoção de crescimento de plantas

A denominação rizobactérias foi criada para definir as bactérias que colonizam o sistema radicular de plantas (Kloepper, 1983). As rizobactérias de vida livre do solo que beneficiam plantas são comumente denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (Melo, I.S., 1998).

Com o propósito de obter aumento no crescimento e rendimento das plantas, iniciou-se na Rússia e Ucrânia em 1885, pesquisas com as rizobactérias não simbióticas *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus*

megaterium e outras espécies de *Bacillus*. Na época se contestou que a promoção de crescimento era devido à inoculação com as rizobactérias, devido a falta de identificação do mecanismo envolvido que justificassem os resultados (Mishustin e Naumova, 1962, citado por Queiroz, 2003).

Mais tarde alguns pesquisadores detectaram a produção de reguladores químicos vegetais como o ácido giberélico e o ácido indol-acético por alguns microrganismos em meio de cultura, sendo sugerido a sua produção como possível mecanismo na promoção de crescimento de plantas (Brown e Burlinghan, 1968; Brown, 1972).

Somente com os trabalhos de Burr et al. (1978) em batata e de Kloepper e Schroth (1978) em rabanete, ficou estabelecido a denominação rizobactérias promotoras de crescimento de plantas ou RPCP (Plant growth-promoting rizobacteria –PGPRs).

Diversas pesquisas demonstram a capacidade de bactérias do solo, mais especificamente da rizosfera, na promoção de crescimento de plantas (Glick, 1995).

As RPCP podem afetar o crescimento da planta direta ou indiretamente (Glick, 1995). Na promoção de crescimento direta, os microrganismos fornecem à planta compostos sintetizados ou facilitam a captação de certos nutrientes do solo. Podem também fixar nitrogênio atmosférico, produzir sideróforos, substâncias com grande afinidade por íons de Fe^{3+} produzidas em condições limitantes de ferro no solo e fornecê-lo a planta; produzir hormônios e ou solubilizar minerais assim como o fósforo, disponibilizando-o para a planta (Glick, 1995). Já a

promoção de crescimento indireta ocorre através da antibiose, promovendo o controle de patógenos, e também pela indução de resistência sistêmica no hospedeiro (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Sturz *et al.*, 2000).

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por bactérias é um processo complexo que pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

A Família *Rhizobiaceae* é um dos mais explorados quanto à promoção de crescimento vegetal. Entretanto, vários estudos têm demonstrado que outros grupos bacterianos que não nodulam, como *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Xanthomonas* e *Klebsiella* podem também promover o crescimento de várias plantas (Costacurta e Vanderleyden, 1995; Hallmann *et al.*, 1997). Um exemplo encontrado na literatura foi a observação de plantas de canola que apresentaram aumento no peso seco quando inoculadas com *Pseudomonas putida* GR12-2 produtora de AIA (Lifshitz *et al.*, 1987).

Existem muitos trabalhos com promoção de crescimento em milho utilizando rizobactérias com resultados positivos (Lalande *et al.*, 1989; Döbereiner e Garcia-Salamone, 1995c; Ikeda *et al.*, 1997; Botelho *et al.*, 1998; Gutiérrez-Zamora e Martínez-Romero, 2001). Em vários países como o México, Argentina, Bélgica entre outros, são usados inoculantes de *Azospirillum* em plantios de milho (Okon, 1985).

São encontrados também exemplos de bactérias endofíticas apresentando aumento em vários tipos de plantações, incluindo tomate

(Bashan et al., 1989b), batata (Sturz, 1995), milho (Hinton & Bacon, 1995), pepino (Van Peer e Schippers, 1989), arroz (Hurek et al., 1994) e algodão (Bashan et al., 1989a). De acordo com Sturz (1995), aproximadamente 10 % de isolados benéficos recuperados de batatas mostraram promover crescimento. A inoculação de arroz com um endófito diazotrófico, *Azoarcus* sp linhagem BH72, resultou numa promoção de crescimento significativa (Hurek et al., 1994).

Os efeitos benéficos das bactérias endofíticas, no entanto, parecem operar através de mecanismos similares aos descritos para as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (Höflich et al., 1994)

3 - DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE MILHO DE DIFERENTES LOCALIDADES DO ESTADO DE SÃO PAULO

Resumo

A diversidade de bactérias endofíticas na cultura de milho (*Zea mays* L.) foi avaliada em plantas coletadas em quatro localidades do estado de São Paulo. A identificação das bactérias foi realizada pelo método de extração dos ácidos graxos (FAME). Um total de 698 bactérias foi isolado de raízes de milho de diferentes partes da planta, sendo que 279 bactérias a partir das raízes. Nas quatro localidades foram identificadas 33 espécies bacterianas pertencentes a 20 gêneros, sendo que os gêneros mais freqüentemente isolados foram: *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* e *Enterobacter*. Os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* foram encontrados em todas as regiões amostradas. A porcentagem por região amostrada foi observada para o gênero *Stenotrophomonas*, seguido por *Bacillus*, que, além disso, também apresentou o maior número de espécies. Houve uma predominância de gêneros bacterianos dentro da filiação taxonômica do grupo das *Proteobactérias*, principalmente a subdivisão gama (γ), pertencente a Família *Enterobacteriaceae*, seguido da filiação do grupo dos *Firmicute*, na Família das *Bacillaceae*.

3.1 – INTRODUÇÃO

As plantas podem ser consideradas um microecossistema complexo onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de bactérias.

Pouco se conhece sobre a diversidade e níveis populacionais das bactérias endofíticas nos diferentes tecidos de plantas saudáveis (Misaghi e Donndelinger, 1990; Döbereiner et al., 1995a). Os estudos com bactérias endofíticas em plantas diversas têm demonstrado que as comunidades endofíticas variam espacialmente na planta (Fisher et al., 1992; Sturz et al., 1997; Mocali et al., 2003), que podem ser dependentes da interação com outras bactérias endofíticas ou patogênicas (Quadt-hallmann e Kloepper, 1996), do genótipo do hospedeiro (Adams e Kloepper, 1998; Mocali et al., 2003) e de fatores ambientais (Pillay e Nowak, 1997; Gardner et al., 1982).

Mundialmente, o milho (*Zea mays* L.) ocupa, entre os cereais, o terceiro lugar em área semeada e em produção global. É utilizado na alimentação humana, animal e na indústria. No Estado de São Paulo, ocupa posição de destaque tanto em área cultivada, como em produção (Agrianual, 2004).

O desenvolvimento do milho transgênico gerou dúvidas sobre a possibilidade de sua interferência nos sistemas biológicos relacionados a esta cultura. Embora o milho seja de grande importância econômica mundial, com exceção dos microrganismos patogênicos, poucos estudos

visando conhecer e obter aplicações práticas da interação bactéria-planta foram realizados.

As bactérias endofíticas proporcionam uma grande versatilidade de utilização, devido ao fato de produzirem vários compostos, os quais podem ser utilizados na indústria; utilizados como agentes de controle biológico de pragas e doenças; utilizados como promotores de crescimento, como alternativa para a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados e fosfatados; e como vetores de genes de interesse, o que é mais simples do que a construção de plantas transgênicas.

Entretanto, vários mecanismos estão envolvidos na interação bactérias endofíticas-planta, na comunidade microbiana e também fatores abióticos. O impacto potencial de diferentes condições de cultivo na diversidade de endófitos bacterianos também deve ser considerado. Neste contexto praticamente não existem trabalhos na literatura.

Portanto, torna-se evidente a necessidade de entendimento desses mecanismos, os quais são vários e complexos, para posterior uso na melhoria da produção agrícola; na diminuição do custo de produção, devido a substituição dos fertilizantes; na diminuição de impacto ambiental causada pelo uso extensivo de fertilizantes e agroquímicos; na utilização em outros setores de atividades humanas, bem como na manutenção e manipulação desses organismos sob condições de campo.

O presente trabalho teve como objetivo, dentro deste contexto, neste tema observar a diversidade de bactérias endofíticas em raízes de

plantas de milho (*Zea mays* L.), coletadas de vários locais no Estado de São Paulo. Sendo que para isso, foram isoladas bactérias endofíticas de vários cultivares híbridos, em diferentes estados fisiológicos.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no laboratório de microbiologia ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Centro Nacional de Pesquisas de Monitoramento Ambiental - CNPMA)

3.2.1 – Locais de coleta e condições de cultivo

As plantas de milho foram coletadas em quatro localidades do Estado de São Paulo: Santo Antônio da Posse, Lins, Salto Grande e Ouroeste. As plantas coletadas estavam saudáveis e em diferentes estádios fenológicos. Em cada localidade, foram retiradas três plantas, com exceção de Lins, onde foram coletadas 6 plantas. As plantas foram removidas e divididas em raiz, colmo e folhas, e cada parte foi colocada em sacos plásticos e transportadas em gelo até o laboratório, onde foram mantidas a 8 °C até o processamento.

Com relação às amostras, foram coletadas plantas pertencentes a vários híbridos e sob diferentes condições de cultivo, como observa-se na Tabela 2. Os estádios fenológicos das plantas coletadas neste trabalho foram nomeados de acordo com a classificação de Gomes e Karazawa (1984). As plantas com 60 dias foram agrupadas no estágio 3,0 (vegetativo), que equivale a doze folhas emergidas; as plantas com

80 dias no estágio 6,0, que equivale ao grão leitoso (granação) e as plantas com 90 dias no estágio 7,0, que equivale ao grão pastoso.

Tabela 2 - Híbridos e tratamentos culturais das plantas de milho coletadas

Localidade	Estádio Fenológico	Híbrido	Herbicida	Inseticida	Época Coleta (Safra 2001)
Lins	3,0	Agrocere AL-25	Glifosato e 2-4D	Piretróide	Abril
Lins	7,0	Agrocere AL-25	Glifosato e 2-4D	Piretróide	
Santo Antonio da Posse	7,0	Agrocere 4051	**	**	Maio
Ouroeste	3,0	Cargil C33	Metolaclo e Atrazina	Piretróide	Junho
Salto Grande	6,0	Agrocere 1051	**	Metomil	Agosto

Legenda: ** = Não houve utilização

3.2.2 - Isolamento e preservação de bactérias endofíticas

Cada uma das partes das plantas coletadas foi lavada em água corrente e em seguida foram desinfetadas superficialmente utilizando o seguinte procedimento: exposição de toda a superfície à luz UV 254 nm, durante 5 minutos. Foram imersas em álcool 70 % por 2 minutos; 5 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5 % de cloro ativo (v/v) e novamente em álcool 70 % durante 30 segundos. Ao final do procedimento todo o material foi lavado quatro vezes em água destilada esterilizada.

Para a verificação da eficiência do processo de desinfetação superficial, alíquotas da água destilada (0,1 mL) utilizada na última lavagem dos tecidos vegetais foram semeadas em meio TSA (tryptona soy agar) 10 % e incubadas a 25 °C durante 10 dias.

De forma asséptica foram retiradas as extremidades de cada parte vegetal e o restante foi assepticamente cortado em pedaços pequenos, cinco dos quais, foram distribuídos em placa de Petri com os meios amido caseína (AC) e tryptona soy agar (TSA). Ambos os meios de cultura foram suplementados com o fungicida Benomil ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Três repetições foram feitas para cada meio por tecido vegetal. As placas com o material vegetal foram incubadas a 25°C e avaliadas diariamente. As colônias bacterianas crescidas a partir dos tecidos vegetais foram transferidas para novas placas de Petri com os mesmos meios de culturas utilizados para o isolamento, sendo purificadas pela técnica de esgotamento por estrias cruzadas.

Após a obtenção de culturas puras, as mesmas foram mantidas em vidros de penicilina com meio de cultura, cobertas com óleo mineral e armazenadas em temperatura ambiente. Esse tipo de armazenamento foi escolhido porque os isolados apresentaram crescimento vigoroso. O meio de cultura utilizado para o armazenamento foi nutriente ágar 50 %, pois todos os isolados apresentaram crescimento ótimo no mesmo.

3.2.3 - Identificação das bactérias

Os isolados foram identificados pela análise dos metil ésters de ácidos graxos (fatty acid methyl-esters - FAMES) da célula bacteriana (ácidos graxos totais).

3.2.3.1 - Extração dos ácidos graxos

As bactérias foram cultivadas em Trypticase Soy Broth Agar (TSBA) BBL, pelo método das estrias cruzadas, e incubadas durante 24 h a 28 °C. As colônias foram raspadas das placas e transferidas para tubos de vidro com rosca (Kimex). As amostras foram primeiramente saponificadas com 1.0 mL de reagente de saponificação (45g de hidróxido de sódio, 150 mL de metanol e 150 mL de água deionizada) e homogeneizadas durante 10 segundos em agitador de tubos de ensaio. Após isso, os vidros foram colocados em água fervendo (100 °C) por 5 minutos, as amostras foram agitadas novamente e recolocadas a 100 °C durante 25 minutos. Em seguida foi adicionado às amostras 2.0 mL de reagente de metilação (325 mL de ácido clorídrico 6 N e 275 mL de metanol), seguido de agitação e incubação a 80 °C por 10 minutos.

Os ácidos graxos (fase orgânica) foram separados da fase aquosa com a adição de 1,25 mL de reagente de extração (200 mL de hexano e 200 mL terc-butil metil éter). A fase aquosa foi descartada e adicionou-se na fase orgânica 3.0 mL do reagente de lavagem (hidróxido de sódio e água destilada), que tem por finalidade fazer a limpeza da fase orgânica a ser analisada. A fase orgânica, contendo os FAMES, foi transferida para os tubos de vidro (“vials”) apropriados para a análise cromatográfica (Sasser, 1990). A análise dos ácidos graxos foi feita utilizando cromatografia gasosa Hewlett-Packard (Agilent GC System Serie 6850).

3.2.3.2 Análise dos ácidos graxos

Os ácidos graxos foram analisados por um programa de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock[®] TSBA versão 5.0, Microbial ID, Newark, DE, USA). Os perfis dos ácidos graxos obtidos foram comparados com os dados contidos na biblioteca TSBA 5.0 (linhagens de referência armazenadas na biblioteca).

O MIDI analisa mais de 300 ácidos graxos e compostos relacionados encontrados nas bactérias. O resultado final é apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando, dessa forma, o microrganismo em questão. Os isolados com índice de similaridade 0,5 ou acima foram considerados positivamente identificados.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 – Isolamento das bactérias endofíticas

Um total de 698 bactérias endofíticas foi isolado de raízes, colmos e folhas (Tabela 3) de plantas de milho coletadas nas diferentes localidades do Estado de São Paulo, sendo que 279 destas bactérias foram isoladas das raízes. Este número provavelmente não revela a realidade, pois foram “selecionadas” as bactérias capazes de se desenvolverem nos meios de cultura utilizados. Tais limitações se aplicam à maioria dos estudos baseados em métodos de cultivo,

entretanto, esses métodos fornecem indicações relativas da estrutura da população microbiana.

Tabela 3 - Locais de coleta no Estado de São Paulo e número de bactérias isoladas em cada parte da planta de milho

REGIÃO	MICROORGANISMO	RAIZ	COLMO	FOLHA	TOTAL
STO ANTONIO DA POSSE	Bactérias	36	41	39	116
	Actinomicetos	19	4	01	24
LINS	Bactérias	155	62	136	353
	Actinomicetos	10	0	0	10
OUROESTE	Bactérias	20	14	37	71
	Actinomicetos	0	2	23	25
SALTO GRANDE	Bactérias	38	23	37	98
	Actinomicetos	1	0	0	01

O número de bactérias isoladas de cada localidade teve grande variação, provavelmente, devido às condições de cultivo, ao tipo de solo e diferentes híbridos. A colonização microbiana de raízes de plantas é afetada por vários fatores bióticos e abióticos assim como exsudatos, competição, nutrientes inorgânicos, pH e tipo de solo, temperatura e uso de agroquímicos (Chiarini et al., 1998; Hallmann et al., 1997). Chiarini et al. (1997), estudando a composição e densidade da comunidade microbiana na rizosfera de milho em diferentes tipos de solo (pH, nutrientes inorgânicos), cultivares e estádios fenológicos, observaram que este último não tem influência na densidade microbiana, mas na estrutura da comunidade. Verificou-se que a estrutura da comunidade microbiana nos diferentes cultivares não variou significativamente, embora constatou-se que o solo teve influência marcante, com variação

significativa na densidade microbiana e na estrutura da comunidade entre os 5 diferentes locais de cultivo do milho.

As plantas de milho amostradas em cada localidade neste estudo foram diferentes, pois as coletas foram realizadas em propriedades que não utilizavam o mesmo híbrido e, também o mesmo manejo de plantas invasoras e pragas. Além disso, as plantas diferiam no estágio fenológico.

3.3.2 – Identificação das bactérias

Foram identificados 75 isolados bacterianos de raízes de milho das diferentes localidades, através dos ácidos graxos da parede celular – MIDI. Não foi possível a identificação de alguns isolados, devido ao fato de não haver referência para comparação na biblioteca utilizada no cromatógrafo e/ou pela falta de crescimento no meio de cultura TSBA BBL utilizado como padrão para comparação dos ácidos graxos na biblioteca.

Houve uma predominância de gêneros bacterianos dentro da filiação taxonômica do grupo das *Proteobactérias* (Tabela 04), sendo a maioria pertencente à sub-divisão gama (γ). O maior número de gêneros endofíticos dentro da γ -*Proteobactéria* pertence à família das *Enterobacteriaceae*.

Tabela 4 - Filiação taxonômica das bactérias endofíticas de raízes de milho isoladas em quatro localidades no Estado de São Paulo

Identificação	Filo	Classe	Ordem
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Pseudomonadales</u>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Xanthomonadales</u>
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Pseudomonadales</u>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> <i>xylosoxydans</i>	<u>Proteobacteria</u>	β -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<u>Proteobacteria</u>	α -Proteobactéria	<u>Rhizobiales</u>
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	<u>Proteobacteria</u>	α -Proteobactéria	<u>Rhizobiales</u>
<i>Sphingobacterium faecium</i>	<u>Bacteroidetes</u>	<u>Sphingobacteria</u>	<u>Sphingobacteriales</u>
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	<u>Bacteroidetes</u>	<u>Sphingobacteria</u>	<u>Sphingobacteriales</u>
<i>Comamonas acidovorans</i>	<u>Proteobacteria</u>	β -Proteobactéria	<u>Burkholderiales</u>
<i>Pseudomonas putida</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Pseudomonadales</u>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<u>Proteobacteria</u>	β -Proteobactéria	<u>Burkholderiales</u>
<i>Microbacterium saperdae</i>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinomycetales</u>
<i>Microbacterium lacticum</i>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinomycetales</u>
<i>Gluconobacter asaii</i>	<u>Proteobacteria</u>	α -Proteobactéria	<u>Rodospirillales</u>
<i>Kocuria varians</i>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinomycetales</u>
<i>Yersinia frederiksenii</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Nesterenkonia halobia</i>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinobacteria</u>	<u>Actinomycetales</u>
<i>Escherichia coli</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Cedeia lapagei</i>	<u>Proteobacteria</u>	γ -Proteobactéria	<u>Enterobacteriales</u>
<i>Paenibacillus macerans</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>Bacillus cereus</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>B. subtilis</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>B. sphaericus</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>B. pumillus</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>B. megaterium</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>Bacillus lentus</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>
<i>B. lentimorbus</i>	<u>Firmicutes</u>	<u>Bacilli</u>	<u>Bacillales</u>

Nas quatro localidades foram identificadas 33 espécies pertencentes a 18 gêneros. Os gêneros encontrados foram: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas*, *Gluconobacter*, *Microbacterium*, *Ochrobactrum*, *Sphingobacterium*,

Cedecea, *Escherichia*, *Paenibacillus*, *Comamonas*, *Methylobacterium*, *Klebsiella*, *Nestereukonia*, *Kocuria* e *Yersinia* (Tabelas 5 e 6). Dentre estes, os gêneros *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* e *Enterobacter* (Tabela 07) foram os mais freqüentes, representando 70,9 % dos isolados identificados.

As plantas coletadas em Lins e Salto Grande foram as que apresentaram a maior diversidade de gêneros de bactérias endofíticas, 11 e 10 respectivamente, dos 18 gêneros identificados (Tabelas 5 e 6). Esse fato pode ser devido ao maior número de plantas coletadas e ao maior número de isolados identificados provenientes deste local.

Os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* foram encontrados em todas as regiões amostradas (Tabela 8). Em Santo Antonio da Posse não foi observado o gênero *Ochrobactrum* e em Ouroeste *Stenotrophomonas*. Esse fato talvez seja devido à identificação de um número pequeno de isolados nas duas localidades. Em Lins, os gêneros *Bacillus* e *Stenotrophomonas*, apresentaram a maior ocorrência, em Salto Grande e Santo Antonio da Posse *Stenotrophomonas* teve a maior ocorrência. Em Ouroeste, foi o gênero *Ochrobactrum*. O gênero *Stenotrophomonas* foi encontrado com maior freqüência em todas as regiões as quais foi observada, seguido por *Bacillus*. Com relação à espécie, nenhuma foi isolada em todas as localidades (Tabelas 5 e 6), entretanto, *Bacillus lentimorbus* foi observado em três localidades, com exceção de Santo Antonio da Posse, enquanto *S. maltophilia* não foi

observada apenas em Ouroeste e *O. anthropi* apenas em Santo Antonio da Posse (Tabela 7).

Tabela 5– Espécies bacterianas endofíticas de raízes de milho isoladas de plantas de Lins, identificadas através dos ácidos graxos

Identificação	% MIDI	Isolados
<i>P. fluorescens B</i>	0,896	7R3/A
<i>Bacillus megaterium</i> GC subgrupo A	0,473	7R9
<i>S. maltophilia</i>	0,621	7R10/A
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,830	7R10/B
<i>Bacillus pumillus</i> GC B	0,596	8R1
<i>S. maltophilia</i>	0,711	8R2/A1
<i>Alcaligenes xylosoxydans-xylosoxydans</i>	0,902	8R2/A2
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,840	8R2/B
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,845	8R2/C1
<i>Pseudomonas putida</i> biotipo A	0,850	8R2/C2
<i>P. putida A</i>	0,814	8R9/A
<i>S. maltophilia</i>	0,628	8R9/A2
<i>S. maltophilia</i>	0,838	8R9/B
<i>B. megaterium</i>	0,752	8R15
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,865	9R1/A
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	0,604	9R1/B
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	0,633	9R2
<i>S. maltophilia</i>	0,610	9R2/A2
<i>Paenibacillus macerans</i>	0,509	9R4/B
<i>Comamonas acidovorans</i>	0,667	9R4/C
<i>Bacillus megaterium A</i>	0,650	9R8
<i>Sphingobacterium faecium</i>	0,601	9R9
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	0,845	9R11
<i>Bacillus subtilis</i>	0,787	10R1/A
<i>S. maltophilia</i>	0,705	10R1/B
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,711	12R1/A2
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,780	12R1/B
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	0,881	12R2D/A
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,802	12R2/C
<i>Bacillus pumillus</i>	0,703	12R3/A1
<i>S. maltophilia</i>	0,701	12R3/B2
<i>Alcaligenes xylosoxydans xylosoxydans</i>	0,876	12R4
<i>Klebsiella pneumoniae-pneumoniae</i>	0,776	12R4/A
<i>B. cereus</i>	0,802	12R6/A
<i>Klebsiella pneumoniae-pneumoniae</i>	0,827	12R8

Tabela 6 - Espécies bacterianas endofíticas de raízes de milho isoladas de plantas de Santo Antonio da Posse, Ouroeste e Salto Grande, identificadas através dos ácidos graxos.

Salto Grande			Santo Antonio Posse			Ouroeste		
Isolado	Identificação	% MIDI	Isolado	Identificação	% MIDI	Isolado	Identificação	% MIDI
19R1C/A	<i>S. maltophilia</i>	0,546	13R2A	<i>Pseudomonas putida</i> biotipo A	0,709	16R1	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	0,539
19R1C/B	<i>O. anthropi</i>	0,865	13R1C	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,615	16R3	<i>O. anthropi</i>	0,829
19R1D/A	<i>S. maltophilia</i>	0,771	13R2C	<i>Bacillus sphaericus</i>	0,734	17R2A/B	<i>O. anthropi</i>	0,869
19R1D/A3	<i>Microbacterium lacticum</i>	0,702	14R1C/B	<i>Alcaligenes xyloxydans</i> <i>xyloxydans</i>	0,640	17R2D	<i>E. cloacae</i>	0,914
19R2A/E2	<i>S. maltophilia</i>	0,905	14R1E/C	<i>S. maltophilia</i>	0,843	17R2D/C	<i>P. stutzeri</i>	0,855
19R2C	<i>Yersinia frederiksenii</i>	0,478	14R2A	<i>Gluconobacter asaii</i>	0,506	17R2F	<i>O. anthropi</i>	0,726
19R2D	<i>E. agglomerans</i>	0,652	14R3A	<i>Microbacterium saperdae</i>	0,619	18R1b/A	<i>Cedecea lapagei</i>	0,739
19R2D/A	<i>B. lentimorbus</i>	0,704	14R3C	<i>S. maltophilia</i>	0,730	18R1B/B	<i>Escherichia coli</i> GC B	0,667
19R2D/B	<i>Escherichia coli</i> GC E	0,844	15R1A/C	<i>Bacillus cereus</i>	0,830			
19R3B	<i>P. putida</i>	0,637	15R1G/B2	<i>S. maltophilia</i>	0,869			
19R3G/A	<i>S. maltophilia</i>	0,650	15R1G/B1	<i>Pantoea agglomerans</i> GC C	0,640			
19R3G/B	<i>S. maltophilia</i>	0,642	15R2B	<i>P. putida</i>	0,670			
19R3G/C	<i>Bacillus cereus</i> GC B	0,687						
20R1A	<i>S. maltophilia</i>	0,800						
20R2C/A	<i>Nestereukonia halobia</i> (<i>Micrococcus</i>)	0,638						
20R2C/B	<i>O. anthropi</i>	0,829						
20R2D/A	<i>B. cereus</i>	0,628						
20R2E/A	<i>Kocuria varians</i> GC A (<i>Micrococcus</i>)	0,722						

Tabela 7 - Gêneros de bactérias isolados de milho em diferentes localidades no Estado de São Paulo.

Gêneros	Porcentagem em relação ao número total de bactérias identificadas
<i>Stenotrophomonas</i>	20,3 %
<i>Bacillus</i>	18,9 %
<i>Pseudomonas</i>	12,7 %
<i>Ochrobactrum</i>	11,4 %
<i>Enterobacter</i>	7,6 %

Tabela 8 – Espécies encontradas nas quatro localidades amostradas pertencentes a um mesmo gênero

Espécies	Lins	Sto Antonio Posse	Ouroeste	Salto Grande
<i>E. cloacae</i>	-	-	14,3 %	-
<i>E. sakazakii</i>	-	8 %	-	-
<i>E. hormaechei</i>	-	-	-	5 %
<i>E. agglomerans</i>	5,9 %	-	-	-
<i>B. lentimorbus</i>	2,9 %	-	14,3 %	5,6 %
<i>B. cereus</i>	2,9 %	8 %	-	11 %
<i>B. sphaericus</i>	-	8 %	-	-
<i>B. subtilis</i>	2,9 %	-	-	-
<i>B. pumillus</i>	5,9 %	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	2,9 %	-	-	-
<i>P. putida</i>	5,9 %	8 %	-	16,7 %
<i>P. mucidolens</i>	2,9 %	-	-	-
<i>P. Fluorescens</i>	2,9 %	-	-	-
<i>P. stutzeri</i>	-	-	14,3 %	-
<i>O.anthropi</i>	11,8 %	-	28,6 %	11 %
<i>S. maltophilia</i>	20,6 %	25 %	-	33 %

Nas raízes de plantas coletadas em Lins foram observadas a maior diversidade de espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Esses resultados demonstram que ocorre uma condição favorável a manutenção desses endófitos em detrimento de outros. O sistema agrícola utilizado, o uso ou não de agroquímicos, o genótipo da planta, o estágio fenológico e o solo podem, de alguma forma, estar influenciando a população de microrganismos do solo e, conseqüentemente, os endófitos, sendo responsáveis pela diferença na diversidade de microrganismos encontrados nas quatro localidades.

Diversos trabalhos têm observado que ocorre uma variação na diversidade de bactérias entre as diferentes espécies de plantas, entre os diferentes cultivares, estádios fenológicos e tratamentos do solo na comunidade rizosférica e endofítica (Sturz et al., 1997; Mocali et al., 2003). Este fato tem sido demonstrado com freqüência na interação simbiótica entre *Rhizobium* sp. as diferentes plantas (Fromin 2001). Zinniel et al. (2002), analisaram a colonização de 222 isolados bacterianos endofíticos de milho e 151 de sorgo (*Sorghum bicolor*) em 27 diferentes espécies de plantas, incluindo legumes, trigo, soja e plantas de pradaria. De 69 endófitos de milho inoculados em sorgo apenas 5 colonizaram. Eles também selecionaram 19 isolados de milho e 10 de sorgo para testes de inoculação nas diversas plantas em casa de vegetação. A maioria dos endófitos, 26 isolados, foram capazes de colonizar no mínimo apenas uma das diferentes espécies testadas. Picard et al. (2000), analisando a população de *Pseudomonas* sp.

rizosféricas de milho observaram uma variabilidade genética em diferentes estágios de crescimento. O solo da rizosfera da planta é citado como a fonte primária para a colonização de microrganismos endofíticos (Hallmann et al., 1997). Muitos autores têm comparado a comunidade bacteriana interna e externa de plantas de algodão (Hallmann et al., 1997) e batata (Sturz, 1995) e, quase todas as bactérias endofíticas, foram também encontradas na rizosfera.

Trabalhos relacionando a comunidade endofítica da planta com práticas agrícolas e tipos de solo são raros. Seghers et al. (2004) comparando sistemas de cultivo orgânico e tradicional, observaram diferenças na comunidade de microrganismos endofíticos nas raízes de milho. Os autores relatam, porém, que não fica claro pelos resultados obtidos, se as diferentes práticas agrícolas afetaram diretamente a comunidade endofítica das raízes, ou indiretamente, por meio de mudanças na comunidade total de microrganismos do solo.

Conn e Franco (2004) mostraram que o tipo de solo afetou a população de actinomicetos endofíticos isolados das raízes de trigo; a maior diversidade de gêneros endofíticos foi obtida de plantas cultivadas em solos com maior população microbiana nativa.

A espécie *Enterobacter cloacae* é considerada um fitopatógeno de importantes culturas. Na década de 70 esta espécie foi isolada de sementes de arroz sem que o seu envolvimento no processo de doenças fosse constatado (Tanii et al., 1974). Na década de 80, Coother e Dowing (1986) noticiaram a patogenicidade da *E. cloacae* em cebolas

armazenadas. No Brasil, a fitopatogenicidade desta bactéria foi primeiramente observada em melões coletados na região nordeste do país (Robbs et al., 1995). *Enterobacter cloacae* é também descrita como um antagonista de *Pythium* sp., que causa podridão das raízes de pepino e aumenta a supressão do solo, em solos infectados com *Fusarium oxysporum*. Bactérias do gênero *Enterobacter* são também citadas como endófitos em plantas de *Citrus jambhiri* (Gardner et al., 1982), *Zea mays* L. (Fisher et al., 1992), *Gossypium hirsutum* (McInroy & Kloepper, 1995), *Citrus sinensis* [L] Obeck cv. Pera, *Citrus reticulata* cv. Blanco (Lacava et al., 2004), arroz (Verma et al. 2001) entre outras.

A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* é encontrada numa variedade de ambientes e regiões geográficas, incluindo a Antártida (Hauben, et al., 1999), assim como promotora de crescimento ou agente simbiote na rizosfera de diversas espécies de plantas, incluindo plantas comerciais como trigo, chicória, beterraba, milho, Girassol, arroz, grama, mostarda tão bem como em solo (Hauben, et al., 1999). Essa espécie foi observada como endófito de milho por McInroy e Kloepper (1995) e Chelius e Triplett (2001). Teixeira, (2004) encontrou *S. maltophilia* como endofítica de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), em raízes, caules e folhas coletados em três Estados do Brasil, São Paulo, Amazonas e Bahia. Esta espécie foi à única isolada em todos os segmentos de mandioca neste estudo. *S. maltophilia* já foi observada como organismo livre em sedimento, água, esgoto, leite, frutas geladas. A notável diversidade de recursos do qual *S. maltophilia* tem sido

isoalada, indica que essa espécie possui uma grande variedade de funções enzimáticas necessárias para adaptação a diferentes habitats. Existem linhagens desta espécie com atuação clínica, as quais têm sido relacionadas a infecções (Hauben, et al., 1999)..

A espécie *Klebsiella pneumoniae* é um endófito comum de milho (Palus et al., 1996; Chelius e Triplett, 2001; McInroy e Kloepper, 1995). Existem também relatos de *Klebsiella* sp. como endófitos de trevo vermelho (Sturz et al., 1998), de videira (Bell et al., 1995) e de arroz (Elbeltagy et al., 2000).

O gênero *Bacillus* foi observado como endofítico por Chelius e Triplett (2001), entretanto a diversidade foi bem menor do que a encontrada neste estudo, foi representada apenas por *B. megaterium* e *B. thuringiensis*. Teixeira (2004) também observou *Bacillus* em mandioca, representando a maior porcentagem em todas as localidades coletadas, sendo representado por algumas espécies observadas neste estudo em raízes de milho como *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. cereus*. Lalande (1989) observou *Bacillus* na rizosfera de milho representando também uma alta porcentagem entre as bactérias encontradas.

As espécies de *Bacillus* mais frequentemente citadas como endófitos são: *Bacillus cereus* (Araújo et al., 2002, Pleban et al., 1995), *Bacillus subtilis* (Bai et al., 2002), *Bacillus megaterium* (Sturz et al., 1997, Elvira-Recuenco e Van vuurde, 2000,), *Bacillus insolitus* (Sturz et al.,

1997), *Bacillus brevis* (Sturz et al., 1997), *Bacillus pumilus* (Araújo et al., 2002).

O gênero *Burkholderia* é considerado um dos microrganismos mais freqüentemente isolados do tecido interno de plantas (Hallmann et al., 1997) e da rizosfera de milho (Cello et al., 1997; Bevivino et al., 1998;). Entretanto não foi observado esse gênero em raízes de milho em nenhuma das localidades neste estudo.

Elvira-Recuenco e Van Vuurde (2000) encontraram *Pantoea* e *Pseudomonas* como os principais gêneros de endofíticos bacterianos em ervilha. *Enterobacter agglomerans* é citada como bactéria endofítica de milho (e outras espécies de plantas (Quadt-Hallmann et al., 1997) como batata doce no Japão (Adachi et al., 2002). O gênero *Pseudomonas* é encontrado em vários tipos de solos, de regiões geográficas e regiões rizosféricas de diversas plantas. Esse gênero tem sido observado como produtor de antibióticos e controlando várias doenças em diferentes cultivares (Raaijmakers et al., 1997).

Lalande et al. (1989) observou *Pseudomonas* sp na rizosfera de milho e Botelho et al. (1998) observaram *Pseudomonas fluorescens* na rizosfera de milho cultivado no Brasil. Fisher et al. (1992), McInroy e Kloepper (1995), Shishido et al. (1999) e Chelius e Triplett (2001) observaram esse gênero como endofítico de milho.

O gênero *Microbacterium* isolado como endofítico por Chelius e Triplett (2001) e Zinniel, et al., (2002) em milho também foi observado por

Teixeira (2004) em mandioca. Este gênero tem sido associado ao controle biológico de nematóides (Hallmann et al., 1999).

Alguns trabalhos relatam o isolamento de *Ochrobactrum anthropi* no solo, na rizosfera das raízes de trigo e como endofítico de diferentes plantas, tais como arroz (Verma et al., 2001), milho (McInroy e Kloepper, 1995) e mandioca (Teixeira, 2004). O gênero *Erwinia* é comum como endofítico de várias plantas comerciais (Hallmann et al., 1997). O gênero *Kocuria* foi observado como endófito de milho por Chelius e Triplett (2001), entretanto a espécie foi *Kocuria palustris* e neste estudo observou-se *K. varians*.

O gênero *Methylobacterium* pertence à Ordem *Rhizobiales*, mas à Família *Methylobacteriaceae*, mostrando filogenia com a família *Rhizobiaceae*. Sy et al. (2001) descreveram uma nova espécie bacteriana, *Methylobacterium nodulans*, formando nódulos e fixando nitrogênio em *Crotalaria*, indicando que outros gêneros além de *Rizobium* podem apresentar um papel importante na fixação de nitrogênio para as plantas.

Esse gênero foi observado como endófito de milho por McInroy e Kloepper (1995), entretanto, Chelius e Triplett (2001) não observaram esse gênero em milho. Em citrus, esse gênero foi observado como um endofítico mais freqüente, incluindo a espécie observada neste estudo *M. mesophilicum*. Esta espécie colonizou raízes e caules de batata e de limão cravo (*Citrus limonia*) quando inoculada (Araújo, 2000). Em soja

(*Glycine max* L) este gênero foi isolado como endofítico quando o fungicida benomil foi utilizado, entretanto não foi observado quando o imazalil foi utilizado, sugerindo uma sensibilidade desta bactéria a este fungicida.

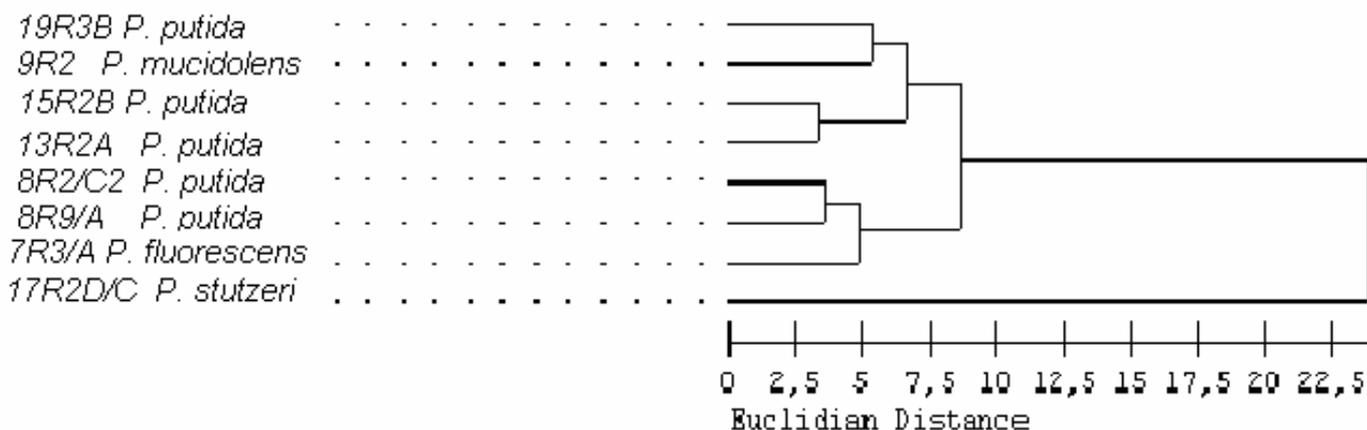


Figura 1 - Dendrograma baseado na composição de ácidos graxos das espécies de *Pseudomonas*, Subdivisão γ -*Proteobactéria*, Família *Pseudomonadaceae*, isoladas das quatro localidades amostradas.

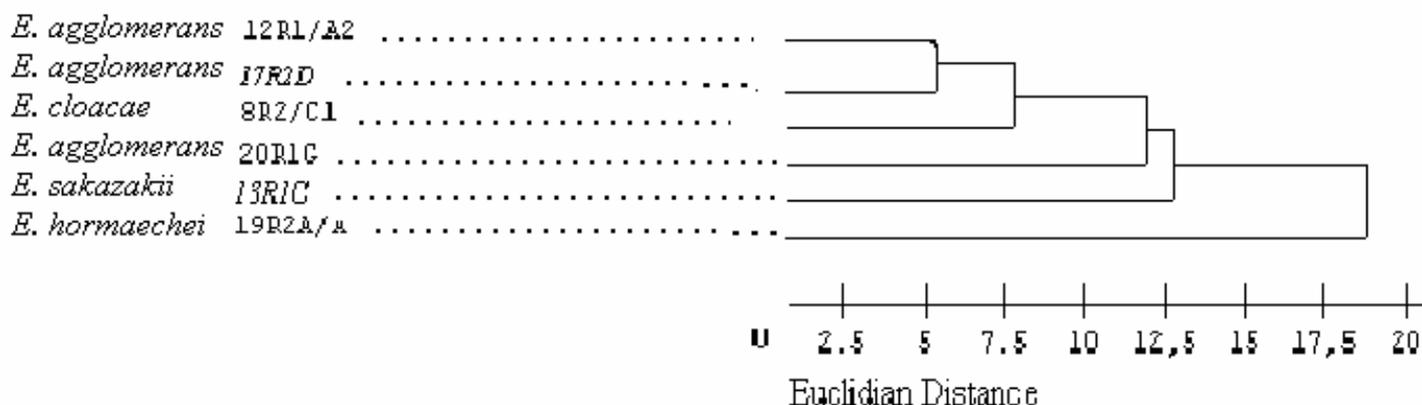


Figura 2 - Dendrograma baseado na composição de ácidos graxos do gênero *Enterobacter* Subdivisão γ -*Proteobactéria*, Família *Enterobacteriaceae*, espécies isoladas das quatro localidades amostradas.

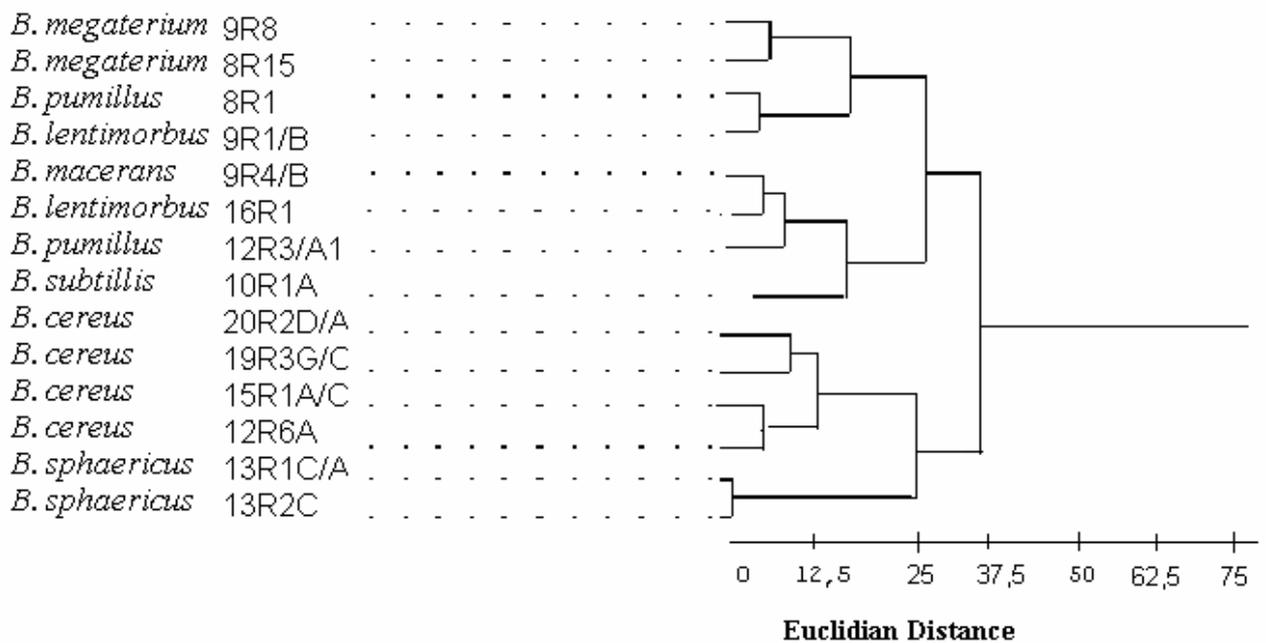


Figura 3 - Dendrograma baseado na composição de ácidos graxos das espécies de *Bacillus*, Subdivisão *Firmicutes*, Família *Bacillaceae*, isoladas das quatro localidades amostradas.

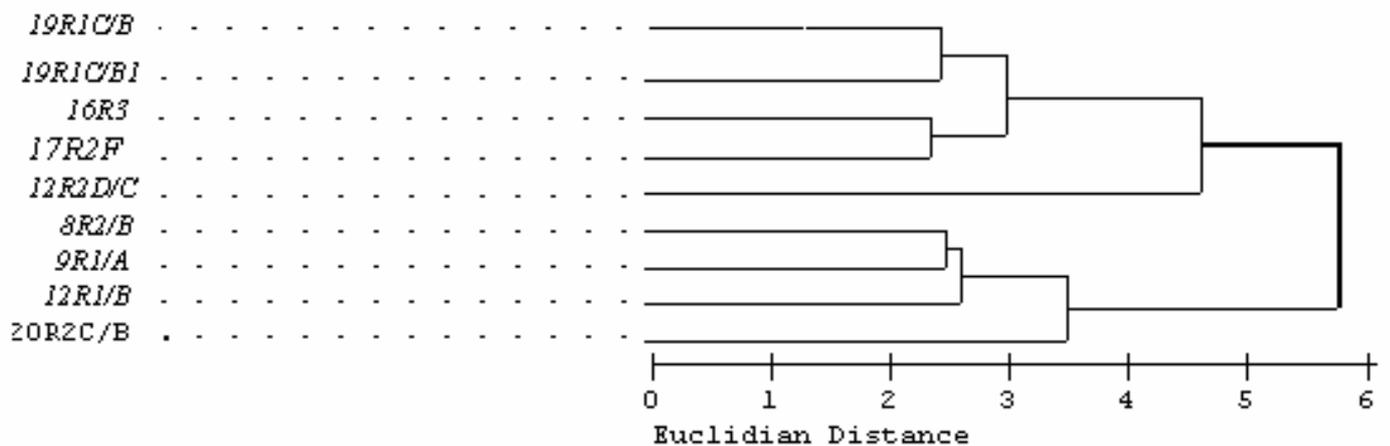


Figura 4 - Dendrograma baseado na composição de ácidos graxos da espécie *Ochrobactrum anthropi* Subdivisão α -*Proteobacteria*, Família *Brucellaceae* isolada de três das localidades amostradas.

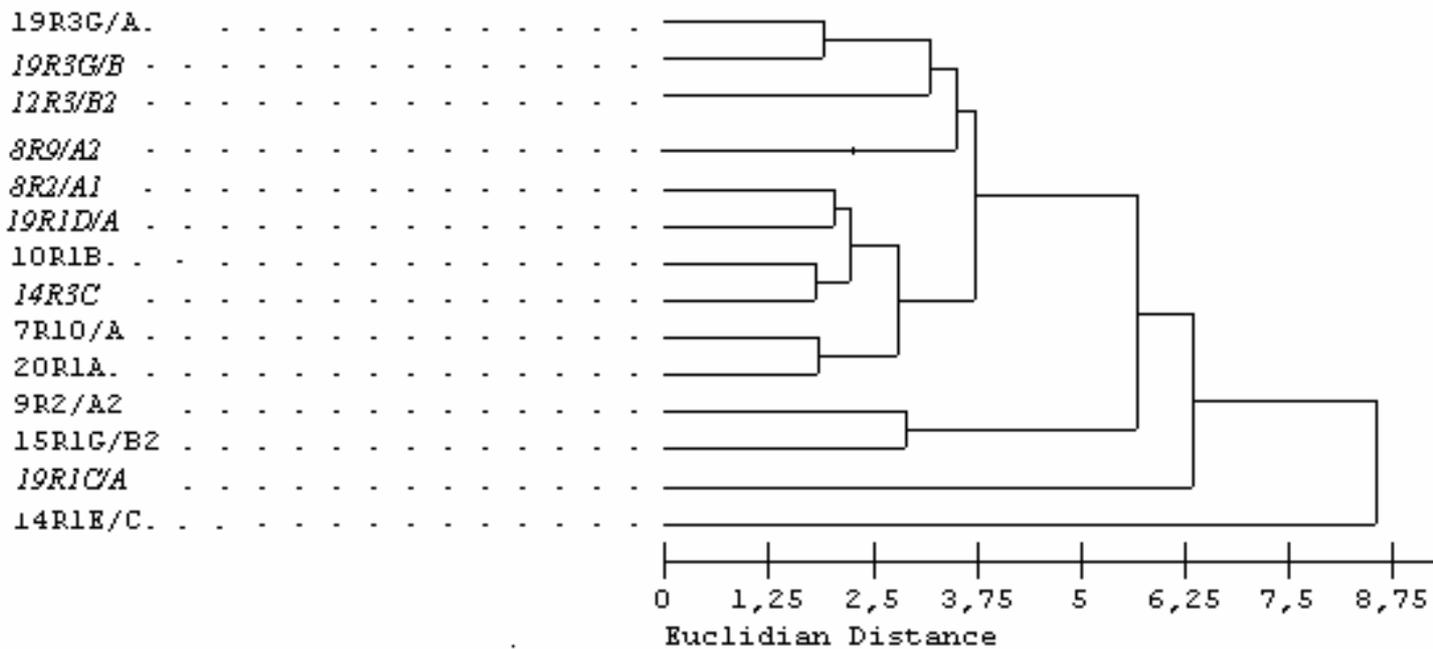


Figura 5 - Dendrograma baseado na composição de ácidos graxos da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, Subdivisão γ -Proteobactéria, Família *Xanthomonadaceae*, isolada de três das localidades amostradas.

Foram construídos dendogramas baseados na análise de ácidos graxos para a verificação da similaridade taxonômica entre algumas das espécies do gênero *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Figuras 1 a 3) e entre os isolados da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* e de *Ochrobactrum anthropi* (Figuras 4 e 5) isoladas das quatro localidades amostradas. Foi observada similaridade entre isolados de diferentes origens para *Enterobacter*, *S.maltophilia* e *Bacillus*, como os isolados 7R10/A e 20R1A (*S. maltophilia*); 12R1/A2 e 17R2D (*E. agglomerans*); 15R1A/C e 12R6A (*B. cereus*). De acordo com o dendrograma da espécie *O. anthropi*, os isolados 8R2/B e 9R1/A encontrados em uma mesma

planta são semelhantes ao isolado 12R1/B encontrado em planta coletada no mesmo local, entretanto em ponto distante e em estágio fenológico distinto. Entretanto, observou-se também que alguns isolados possuem uma alta similaridade com os isolados de plantas de locais diferentes e baixa similaridade com os isolados do mesmo local, como exemplo a espécie *S. maltophilia* com o isolado 14R1E/C distante dos isolados do mesmo local, enquanto os isolados de locais diferentes como 9R2/A2 e 15R1G/B2 possuem são similares.

Um resultado importante deste estudo é a observação das espécies *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus sphaericus*, *B. lentimorbus*; *B. cereus*, *B. lentus*, *Paenibacillus macerans*, *Methylobacterium mesophilicum*, *Pseudomonas mucidolens*, *Alcaligenes xylosoxydans-xylosoxydans*, *Ochrobactrum anthropi*, *Nestereukonia halobia*, *Kocuria varians*, *Comamonas acidovorans*, *Sphingobacterium faecium*, *Sphingobacterium multivorum*, *Gluconobacter asaii*, *Alcaligenes faecalis* e *Cedecea lapagei* como endofíticas de raízes de milho. Este é um dos poucos relatos existentes na literatura sobre a ocorrência destas espécies bacterianas como endófitos de milho.

O mesmo é verdadeiro para os gêneros *Nestereukonia*, *Gluconobacter* e *Cedecea*. Neste trabalho foram encontrados *Ochrobactrum anthropi* e *Methylocaterium* sp em segmentos de raízes, enquanto que McInroy e Kloeper (1995) os tinham observado apenas em colmos de milho. O mesmo ocorreu com *E. agglomerans*, que foi

encontrada em raiz neste trabalho, enquanto Fisher et al. (1992) a observaram apenas em colmos de milho.

Os resultados da análise da diversidade genética indicam que fatores como estágio de desenvolvimento, genótipo, tratamento do solo e tipo de solo podem estar influenciando a comunidade microbiana endofítica de raízes saudáveis de milho. Alguns trabalhos compartilham com estas observações em relação a outros hospedeiros (Sturtz et al., 1997; Dalmastri et al., 1999; Cheneby et al., 2000; Fromin et al., 2001; Mocali et al., 2003).

Neste trabalho e nos estudos já citados anteriormente sobre a diversidade de bactérias endofíticas de milho, houve a observação de um grande número de gêneros e espécies.

A Família *Enterobacteriaceae* representou quase a totalidade das espécies dentro do grupo *Proteobacteria* da sub-divisão gama (γ). O mesmo foi observado em soja (Sobral, 2003) e em mandioca (Teixeira, 2004). Esse fato indica que essa Família pode estar melhor adaptada as condições das plantas de milho em clima tropical, pois não foi observada a diversidade através de metodologia sem o cultivo.

3.3 – CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

1) Os gêneros das bactérias obtidas variaram de acordo com a região de coleta e, provavelmente, pelo genótipo e estágio fenológico da planta, bem como pela prática de cultivo.

2) O milho serve como habitat para uma microflora endofítica diversa. O grupo *Proteobacteria* prevaleceu nas comunidades bacterianas endofíticas e sua subdivisão gama e a Família *Enterobacteriaceae* foi a mais freqüente e com maior diversidade, sugerindo uma adaptação ao genótipos das plantas de milho amostradas.

3) As espécies *P. putida*, *B. cereus*, *B. lentimorbus*, *O. anthropi* e *S. maltophilia* foram isoladas em mais de um local, evidenciando a adaptação a diferentes cultivares e condições de cultivo.

4) Existe uma similaridade taxonômica entre algumas das espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus* e entre os isolados das espécies *Stenotrophomonas maltophilia* e *Ochrobactrum anthropi* isoladas das quatro localidades amostradas. Alguns isolados possuem uma alta similaridade com isolados de plantas de locais diferentes e baixa similaridade com os isolados do mesmo local.

4. Promoção de Crescimento de Plantas de Milho por Bactérias Endofíticas

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo isolar bactérias endofíticas de raízes de milho com potencial para promoção de crescimento da planta. Os parâmetros avaliados foram a capacidade de fixar N_2 atmosférico, de produzir o ácido indolacético (AIA) e de solubilizar fosfato inorgânico, totalizando 129 isolados bacterianos endofíticos de plantas de milho provenientes de diferentes localidades do estado de São Paulo. O potencial para fixação do N_2 atmosférico foi avaliado pelo crescimento das bactérias em meio de cultura livre de nitrogênio e pela presença do gene *nif H*. A seleção de bactérias produtoras de AIA foi realizada utilizando-se a técnica qualitativa e a quantificação foi obtida através da leitura em espectrofotômetro após a adição do reagente de Salkowski. Espécies bacterianas endofíticas com capacidade de sintetizar AIA, de fixar nitrogênio, possuindo o gene *nif H*, e capazes de solubilizar, fosfato foram encontradas nas quatro localidades do Estado de São Paulo, sendo classificadas na grande maioria, dentro do subgrupo das *Proteobacteria* e dos *Firmicutes*. O maior número de bactérias com os mecanismos selecionados foi isolado de plantas coletadas em Lins. Dos gêneros com capacidade para a produção de AIA, *Stenotrophomonas* representou 18 %, *Bacillus* 16 %, *Ochrobactrum* 10 % e *Pseudomonas* 8%. Foram observadas espécies com alta produção de AIA, destacando-se *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. lentimorbus*, *Methylobacterium mesophilicum*,

bem como alguns isolados não identificados. Observou-se também que uma mesma espécie isolada de várias localidades produziu quantidades diferentes do hormônio AIA, demonstrando que as mesmas podem ser consideradas linhagens diferentes da mesma espécie. Com relação à capacidade de fixação de nitrogênio, observou-se um grande número de linhagens de bactérias envolvidas na fixação. Os isolados capazes de crescer no meio NFb pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Enterobacter*, *Sphingobacterium*, *Cedecea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Alcaligenes* e *Methylobacterium*. O gênero *Bacillus* apresentou o maior número de espécies capazes de crescimento em meio livre de nitrogênio, sendo representado por *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. lentimorbus* e *B. sphaericus*. A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* foi observada como diazotrófica em raízes de milho em três das localidades amostradas. Dos isolados positivos para o crescimento em NFb, 89,7 % foram de plantas coletadas em Lins, 82 % de Sto Antonio da Posse, 80 % de Ouroeste e 93 % de Salto Grande. A amplificação por PCR do gene *nif H* foi observada em 23 linhagens isoladas de plantas coletadas nas quatro localidades. Dos isolados positivos para a presença do gene *nif H*, 70 % foram de plantas coletadas em Lins, 42 % de Santo Antonio da Posse, 22 % de Ouroeste e 54,5 % de Salto Grande. Foi observada discrepância entre a proporção de isolados bacterianos com capacidade para crescer em meio de cultura livre de nitrogênio e isolados que apresentaram reações de PCR positivas para o gene *nif H*, devido provavelmente ao fato das bactérias apresentarem diferentes seqüências de nucleotídeos entre e também dentre diferentes espécies

microbianas para o gene *nif H* (Zehr et al., 2003). Portanto os isolados bacterianos que foram capazes de crescer em meio livre de nitrogênio podem apresentar seqüências diferentes daquelas amplificadas com os *primers* descritos por Ueda et al. (1995). Do total de isolados testados quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, apenas as linhagens 12R4/B e 14R3B foram negativas. O maior número de linhagens com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico foi observado em plantas coletadas em Lins, representando 46,3%. Foram selecionados 32 isolados obtidos das plantas de milho para os testes de promoção de crescimento em casa de vegetação. Bactérias endofíticas pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Microbacterium saperdae*, *S. maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas mucidolens* promoveram o aumento de peso de raiz e da parte aérea de plantas de milho, apresentando potencial aplicação biotecnológica.

4.1 – INTRODUÇÃO

As bactérias associadas às plantas são consideradas endofíticas quando habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Petrini, 1991). A presença destas bactérias nas plantas tem sido associada à promoção do crescimento de várias culturas, entre elas batata (Sturtz, 1995), batata doce (Reiter et al., 2003), milho (Hinton e Bacon, 1995) arroz (Verma, et al., 2001), algodão (Bashan et al. 1989b).

A promoção do crescimento das plantas por bactérias pode ser resultante de ações indiretas, como por exemplo, a supressão de doenças, ou de ações diretas, como a produção de hormônios vegetais, fixação do N₂ atmosférico, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (Mariano e Kloepper, 2000; Tan e Zou, 2001). O mecanismo de promoção do crescimento vegetal por bactérias é, porém, um processo complexo, que pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos (Bloemberg e Lugtenberg, 2001). Neste aspecto, os estudos de ecologia microbiana que buscam contribuir com os conhecimentos a respeito dos processos interativos no ambiente podem auxiliar o entendimento destes processos.

O suprimento adicional de nitrogênio para as plantas pelos endófitos diazotróficos seria uma forma direta que esses microrganismos utilizariam para promover o crescimento de diferentes culturas. O elemento nitrogênio é altamente abundante na atmosfera e é o maior componente das proteínas na dieta humana. Porém, a disponibilidade do N fixado é o fator mais limitante do rendimento em muitos sistemas de produção agrícola. Os agroquímicos nitrogenados são responsáveis por mais de 30% dos fertilizantes totais necessários para as culturas agrícolas (Muthukumarasamy et al., 2002). Com o aumento do custo destes fertilizantes e com a crescente preocupação com os possíveis danos ambientais decorrentes de seu uso, o papel da fixação biológica do nitrogênio, em outras plantas, que não as leguminosas, é de extrema importância para a condução sustentável da agricultura.

A fixação do nitrogênio por diazotróficos endofíticos tem sido pouco comprovada. Porém, alega-se que esses microrganismos têm uma vantagem sobre os diazotróficos associativos de raízes, uma vez que ocupam espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro e, portanto, com maior acesso às fontes de carbono e podendo transferir muito mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos para a planta. Além disso, eles colonizam nichos protegidos do oxigênio, condição necessária para a expressão e atividade da nitrogenase (Dobbelaere et al., 2003)

Para uma possível aplicação no campo, objetivando o aumento da produção agrícola, há um grande interesse no isolamento de linhagens bacterianas que apresentem mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como fixar nitrogênio e sintetizar auxina, solubilizar fosfato e produzir sideróforos ou produzir antibióticos e fixar nitrogênio (Verma *et al.*, 2001). Neste aspecto as bactérias endofíticas levam vantagem, pois estão sujeitas a uma menor competição e estão livres de predação dentro dos tecidos das plantas se comparado com o solo. Poucos trabalhos explorando estes aspectos foram realizados.

O presente trabalho teve como objetivos selecionar bactérias endofíticas com capacidade para fixar nitrogênio atmosférico, produzir auxina, e solubilizar fosfato inorgânico e avaliar o efeito destas bactérias na promoção de crescimento de milho.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 – Seleção de bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio

4.2.1.1 - Capacidade de crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio

As linhagens de bactérias endofíticas foram avaliadas quanto à capacidade de fixar N₂ através do crescimento em meio de cultura sem fonte de nitrogênio. As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura semi-sólido NFb (Döbereiner *et al.*, 1995b) por meio de agulhas introduzidas até o final do conteúdo. O período de incubação foi de uma semana a 28°C. A avaliação foi feita através da comparação do crescimento com o controle positivo *Azospirillum brasilense* (Embrapa-BR 11001). O resultado positivo foi caracterizado pela presença de um halo de crescimento no interior do meio de cultura ou pela mudança de cor do meio para azul, o que indica fixação de nitrogênio.

4.2.1.2 – Seleção de bactérias que codificam o gene *nif H*

Extração de DNA genômico total

As bactérias foram cultivadas em meio TSBA por 24 horas a 28°C e cerca de 50 mg do material crescido na superfície das placas foi retirado e transferido para tubos de centrifuga (ependorfs) de 1,5 µL com rosca. As células foram suspensas em 500µl de Tampão de extração -TE pH 8,0 e centrifugadas (15 min.

a 13000 x g). Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 500 µL de TE, onde foram adicionados 30 µL de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10% e 0,5 g de sílica. O material foi agitado em “bead beating” (Biospec products) por 30 seg., para lise da parede celular. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio e precipitado com isopropanol e NaCl (5M). A lavagem do DNA foi realizada com etanol 70%, que foi descartado. O DNA foi colocado para secar a 37°C. Após a resuspensão do material em 50 µL de água ultra pura (Milli-Q), o mesmo foi estocado a -20 °C.

Amplificação do gene *nif* por meio de PCR

A seleção de bactérias portadoras do gene *nif* H foi realizada através da técnica de PCR com o uso de “primers” específicos (Tabela 09). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 30 a 50 ng de DNA molde (extraído de de cada bactéria); 1 µM de cada “primer”; 0,2 mM de cada dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 2,5 µL do tampão da enzima (10X) e 0,5 U/µL da Taq DNA polimerase (Life Technologies) em 20 mM de Tris-HCL pH 8,4 e 50 mM KCL. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo sem o DNA molde.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador Peltier PTC200, programado para realizar uma desnaturação inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos, cada um compreendendo desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, anelamento a 51 °C por 30 seg. e extensão a dos primers 72 °C por 30 seg.. Após os ciclos a extensão final foi a 72 °C durante 7 min. Após a amplificação, 5 µL da reação de PCR foram observados por eletroforese em gel de agarose (1,2 % p/v)

em tampão 1 x TEB e corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) (Sambrook *et al.*, 1989), juntamente com o marcador de peso molecular DNA “Ladder” 100pb (Life Technologies), para a visualização de um fragmento de aproximadamente 400 pb (pares de bases).

TABELA 09 - “Primers” utilizados para a detecção dos genes *nif* em bactérias endofíticas de raízes de milho.

Gene	“Primer”	Sequência	Referência
<i>NifH</i>	19F	5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3'	Ueda <i>et al.</i> , 1995
	407R	5'-AAICCRCCRCAIACIACRTC-3'	

4.2.2 – Seleção de bactérias produtoras de Ácido Indol Acético (AIA)

As bactérias endofíticas foram avaliadas quanto à capacidade de sintetizar *in vitro* ácido indol-acético – AIA, utilizando-se a técnica qualitativa segundo Bric *et al.* (1991), modificada. As bactérias foram cultivadas em meio TSA 10 %, suplementado com 5 mM de L-triptofano (100 µg mL⁻¹) e cobertas com membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia) e, incubadas durante 42 h a 28°C. Após esse período, as membranas foram removidas e tratadas com 10 mL do reagente de Salkowski durante 10 min. Os experimentos foram realizados em duplicatas e a presença de um halo rosa a violeta indicou a produção de AIA. Como controle positivo foi utilizado a linhagem endofítica de citros, produtora de AIA, ARB/18 *Pantoea agglomerans*, cedida pelo laboratório de genética da Esalq/USP.

4.2.3 - Quantificação do AIA produzido pelas bactérias

Os níveis de AIA secretados pelas bactérias no meio de cultura foram estimados cultivando-as em meio líquido TSB (Trypticase Soy Agar) suplementado com 10 g.L⁻¹ de dextrose, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Fett et al. 1987) e 5 mM de L-triptofano (1000 µg.mL⁻¹). As culturas foram mantidas a 28°C, no escuro, sob agitação constante, durante 24 horas. Após esse período, foram centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos, para a obtenção do sobrenadante. A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada através da mistura de 5 mL de reagente de Salkowski (mod. Tang & Bonner, 1947 In: Ehmann, 1977) com 1 mL do sobrenadante da cultura, seguido da leitura da absorbância em 530 nm, após 30 minutos (Hartmann *et al.*, 1983). A concentração de AIA no meio de cultura foi determinada pela comparação com uma curva padrão.

4.2.4 - Seleção de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato

A seleção de linhagens bacterianas capazes de solubilizar fosfato *in vitro* foi realizada com o uso do meio de cultura sólido NBRIY (Nautiyal, 1999), contendo fosfato insolúvel. Após o período de incubação de 14 dias a 28 °C, efetuou-se a observação da presença de halo, indicativo de solubilização do fosfato.

4.2.5 - Promoção de crescimento de milho

Os ensaios visando à promoção de crescimento de milho foram realizados em casa-de-vegetação da Embrapa Meio Ambiente – CNPMA (Centro Nacional de

Pesquisas de Meio Ambiente) em Jaguariúna. A casa de vegetação é construída em policarbonato, com sistema de resfriamento, janelas zenitais e laterais automatizadas, com temperaturas do ar variando de 22 °C a 30 °C.

Para comprovação dos efeitos benéficos, foram utilizadas algumas linhagens bacterianas que apresentaram independentemente produção de AIA, atividade quanto à fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato, bem como, linhagens com mais de uma combinação e até mesmo linhagens negativas as atividades testadas.

Para a obtenção dos inóculos, as bactérias foram crescidas em meio de cultura líquido durante 24 h e incubadas a 28° C, em agitação constante (120 rpm). Após o crescimento as culturas foram centrifugadas a 13.000g e ressuspensas em solução salina. (NaCl 0,85 %).

A inoculação das bactérias nas sementes foi obtida através da imersão das mesmas nas suspensões bacterianas mantidas em agitação. O controle foi obtido com sementes imersas apenas em solução salina. Foram utilizadas as sementes do milho híbrido simples BR 1010 (Embrapa Milho e Sorgo) sem tratamento com fungicida.

Após a desinfetação, as sementes foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 900 ml com solo bi-esterilizado mais areia na proporção de 3:1. A areia foi lavada em água corrente e o solo, procedente da fazenda experimental da Embrapa Meio Ambiente, teve seu pH corrigido para 5,8, com uso de 2g de calcário dolomítico/litro de solo, trinta dias antes da instalação do ensaio. O solo foi bi-esterilizado, em intervalos de dois dias, em autoclave vertical a temperatura de 120 °C. Os vasos foram lavados com hipoclorito de sódio 2,5 %.

As sementes foram semeadas e após a emergência foi efetuado o desbaste.

4.2.5.1 Experimentos

As particularidades de cada experimento serão dadas a seguir

I e II

Dois lotes de isoladas bacterianas foram divididos para propósito experimental, assim, os isolados bacterianos M3A; 7R3/A; 9R8; 12R3/A2; 13R2C/A; 14R1E; 14R1C/A; 15R1G/B2; 16R3; 18R3A; 18R1b/B; 19R2D/A; BR 11001; foram utilizados num ensaio e os isolados OG; 9R8; 12R2; 12R8; 17R2F; 17R2A; 18R3A; 18R3A/B; 19R2D em um segundo ensaio.

Para a obtenção dos inóculos, as bactérias foram crescidas no meio caldo nutriente 10 % suplementado com dextrose (10g) e extrato de levedura (5g), durante 24 h a 28 °C. A inoculação das sementes foi obtida através da imersão das mesmas nas suspensões bacterianas durante 12 h, a 25 °C, em agitação.

A desinfetação das sementes foi feita utilizando etanol 70 % durante 5 minutos, seguida de lavagem em água destilada esterilizada, e hipoclorito de sódio 2,5 % durante 8 min. e lavadas 3 vezes em água destilada estéril. Foram utilizadas 8 réplicas distribuídas em blocos ao acaso.

III

Neste experimento foram testados os isolados 9R8; 10R1/B; 14R3A e 16R3
As bactérias foram cultivadas por 24 horas em meio TSB 10 %. A desinfetação das sementes foi feita utilizando etanol 70 % durante 5 minutos,

seguida de lavagem em água destilada esterilizada, e hipoclorito de sódio 2,5 % durante 8 min. Efetuou-se mais 5 lavagens, após as quais, as sementes foram deixadas de molho na última água de lavagem durante 3 h. Após esse período, foram colocadas em banho-maria a 60 °C por 8 min., e secas em papel de filtro.

Utilizou-se solos esterilizado e natural suplementado apenas com zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) e suplementado com zinco + NPK (N = uréia; P = super fosfato simples; K = cloreto de potássio). Foram utilizadas 6 réplicas distribuídas em blocos ao acaso.

IV

Neste experimento foram testados os isolados 9R1/A; 9R1/B; 10R1/A; 13R1C; 14R1C/B; 17R1A; 17R1D/A; 17R2D

As bactérias foram crescidas em meio TSB 10% + 10g de dextrose, durante 36 h, a 28 °C. As sementes foram desinfetadas como no experimento anterior.

O plantio foi feito utilizando solo bi-esterilizado (pH=5,8), suplementado com Zn e NPK. Os vasos foram regados com solução de micronutrientes, inclusive no controle, após o plantio. Foram utilizadas 6 réplicas distribuídas em blocos ao acaso.

V

Neste experimento foram testados os isolados 9R1/A; 9R2; 9R4/C; 9R8; 12R3/A1; 13R2C; 16R3; 17R2D/C.

O plantio foi feito utilizando solo bi-esterilizado (pH=5,8), suplementado com Zn e NPK. As sementes foram desinfetadas como no experimento IV. Foram utilizadas 9 réplicas distribuídas em blocos ao acaso.

4.2.5.2 - Avaliação promoção de crescimento

Os parâmetros avaliados em todos os ensaios corresponderam à biomassa seca. As plantas foram coletadas 30 dias após a emergência. As raízes foram lavadas em água corrente para remoção do solo aderido, separando-se o sistema radicular da parte aérea das plantas. A avaliação da promoção de crescimento foi realizada mediante a comparação do peso seco das raízes e parte aérea das plantas tratadas e o controle.

Em todos os experimentos utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa SAS (Proc GLM no SAS Copyright © 1989-1996; SAS Institute, Cary, NC, USA). A ANOVA foi analisada com delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 10 % de significância. O teste de Duncan foi aplicado para a comparação entre as médias.

4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi utilizado um total de 129 isolados bacterianos endofíticos de raízes foi utilizado nos diferentes experimentos para análise do potencial para promoção de crescimento de milho.

4.3.1 – Seleção de bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio

A capacidade de fixar nitrogênio é restrita aos procariontes, e mesmo dentro deste grupo a propriedade não é universal. As bactérias com essa propriedade são chamadas diazotróficas.

4.3.1.1 - Capacidade de crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio

As bactérias que crescem no meio de cultura NFb, que não contém nitrogênio, têm a capacidade de fixá-lo. Foram testadas 86 bactérias endofíticas de raízes (Tabela 10) em relação à capacidade de fixação de nitrogênio no meio de cultura NFb. Com o crescimento o meio de cultura muda de cor de verde-azulado para azul devido à alteração no pH (Figura 06).

O gênero *Azospirillum*, devido a sua característica de aerotaxia, se desloca para a região do meio de cultura onde a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias. Nessa faixa, formam-se películas em forma de véu, movendo-se em direção à superfície, quando as células atingem número suficientemente elevado, para escoar o O₂ excessivo que se acumula em volta das mesmas, ativando a nitrogenase (Döbereiner et al., 1995b). A formação de película era inicialmente considerada uma característica do gênero *Azospirillum*, entretanto, estudos têm demonstrado que outras bactérias microaeróbicas, incluindo as diazotróficas, também poderiam formar a película

(Haahtela et al., 1981). Do total de isolados testados, apenas 10 bactérias não foram capazes de crescer no meio livre de nitrogênio (Tabela 10). Os isolados capazes de crescer no meio NFb pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Enterobacter*, *Sphingobacterium*, *Cedecea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Alcaligenes* e *Methylobacterium*. As películas foram observadas nas espécies *Bacillus megaterium*, *Bacillus lentimorbus*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas putida*, *Sphingobacterium faecium*, *Alcaligenes xylosoxydans*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum antropi*, *Cedecea lapagei*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Microbacterium saperdae*. Dos isolados testados para o crescimento em NFb, a maior porcentagem foi obtida para os isolados de Salto Grande com 93 % (Figura 06).



Figura 6 - Crescimento bacteriano em meio de cultura NFb livre de N₂,

a fixação de nitrogênio é indicada pela cor azul. Amostra 1-Controle; 2-9R1/A; 3-8R2/C2; 4-8R9/B; 5-9R1/B; 6-19R1A com crescimento apenas na superfície.

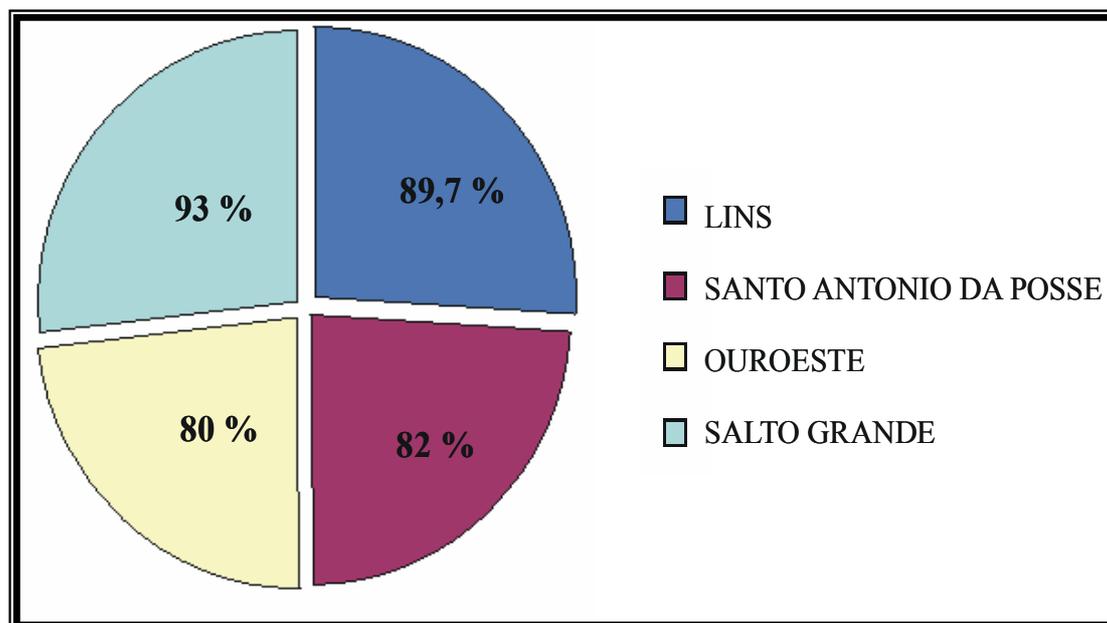


Figura 7 - Porcentagem de isolados endofíticos de raízes de milho com capacidade de fixação de nitrogênio

Neste trabalho o gênero *Bacillus* apresentou o maior número de espécies capazes de crescimento em meio livre de nitrogênio, sendo representado por *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. lentimorbus* e *B. sphaericus*.

Enquanto neste trabalho observou-se um grande número de linhagens capazes de crescimento no meio livre de nitrogênio, Teixeira (2004) observou em mandioca apenas 18 linhagens endofíticas em três estados, dentre estas estavam *B. cereus*, *B. pumilus* e *B. megaterium*. Hübner et al. (2004), também observaram o crescimento de várias espécies de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. firmes*) em meio de cultura livre de nitrogênio. Estes autores relatam que estes isolados foram capazes de acumular quantidades de N semelhantes àquelas fixadas por culturas-padrão e, portanto, foram considerados diazotróficos.

Tabela 10 - Resultados do crescimento no meio NFb de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays*)

Lins								
Isolado	Bactérias	NFb	Isolado	Bactérias	NFb	Isolado	Bactérias	NFb
7R3/A	<i>P. fluorescens B</i>	+	8R4	NI	-	10R1/B	<i>S. maltophilia</i>	+
7R3/B	NI	+P	8R9/A	<i>Pseudomonas putida</i>	+	12R1B	<i>O. anthropi</i>	-
7R5	NI	+P	8R9/A2	<i>S. maltophilia</i>	+	12R1/A2	<i>Enterobacter agglomerans</i>	+
7R6/A	NI	+P	8R9/B	<i>S. maltophilia</i>	+	12R2D/A	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	+
7R9	NI	+P	8R12	NI	+	12R2/B	NI	-
7R9/B	NI	+P	8R15	<i>B. megaterium</i>	+P	12R2/C	<i>O. anthropi</i>	+
7R10/A	<i>S. maltophilia</i>	+	9R1/A	<i>O. anthropi</i>	+	12R3/A	NI	+P
7R11	NI	+P	9R1/B	<i>B. lentimorbus</i>	+	12R3/A1	<i>Bacillus pumillus</i>	+
8R1	<i>Bacillus pumillus</i>	+	9R2	<i>P. mucidolens</i>	+P	12R3/B	NI	+
8R2/A1	<i>S. maltophilia</i>	+	9R4/A	NI	+P	12R4	<i>Alcaligenes xylosoxydans-</i>	+P
8R2/A2	<i>Alcaligenes xylosoxydans-</i>	+	9R8	<i>Bacillus megaterium</i>	+	12R5	NI	+P
8R2/B	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	+	9R9	<i>S. faecium</i>	+P	12R6	NI	+P
8R2/C2	<i>Pseudomonas putida</i>	+	9R11	NI	-	12R9	NI	+
Santo Antonio da Posse			Ouroeste			Salto Grande		
Isolado	Bactérias	NFb	Isolado	Bactérias	NFb	Isolado	Bactérias	NFb
13R1	NI	+	16R1	<i>Bacillus lentimorbus</i>	+P	19R1A	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	+
13R2A	<i>Pseudomonas putida</i>	+	16R3	<i>O. anthropi</i>	+	19R1B	NI	+P
13R2A/B	NI	+P	17R1D/A	NI	-	19R1D/A	<i>S. maltophilia</i>	+
13R2C	<i>Bacillus sphaericus</i>	-	17R1B/B	NI	+P	19R1C/A	<i>S. maltophilia</i>	+P
13R2C/A	NI	+P	17R1A	NI	+P	19R2A/B	NI	+P
14R1	NI	-	17R2D	<i>E. cloacae</i>	+P	19R2A/E	NI	+
14R1F	NI	+P	17R2D/A	NI	+	19R2C	<i>Yersinia frederiksenii</i>	+
14R1C/B	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	+P	17R2F	<i>O. anthropi</i>	+P	19R3E	NI	+
14R1E/A	NI	+	18R1B/A	<i>Cedecea lapagei</i>	+P	19R3G/A	<i>S. maltophilia</i>	+
14R1E/C	<i>S. maltophilia</i>	+	18R1B/B	<i>Escherichia coli</i>	-	19R3G/B	<i>S. maltophilia</i>	+
14R1F	NI	+	18R1G/A	NI	+P	19R3G/C	<i>Bacillus cereus</i>	-
14R3F	NI	-	18R2G/B	NI	+P	20R1A	<i>S. maltophilia</i>	+
14R3A	<i>Microbacterium saperdae</i>	+P	18R3A	NI	+	20R2C/B	<i>O. anthropi</i>	+
15R1A	NI	+	18R3B	NI	+	20R3D/B	NI	+
15R1G	NI	+P	18R3C	NI	-	Controle	<i>A. brasilense</i>	+P
15R1G/B2	<i>S. maltophilia</i>	+						
15R2B	<i>P. putida</i>	+P						

Legenda : P = formação de película

A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* foi observada como diazotrófica em raízes de milho em três das localidades amostradas. Até o presente momento o gênero *Stenotrophomonas* não tem sido citado na literatura como diazotrófico. Recentemente, Costa (2003) e Teixeira (2004) observaram essa espécie como endofítica diazotrófica em cactácea e mandioca, respectivamente.

Rennie et al. (1982) isolaram *Enterobacter cloacae* como diazotrófica de raízes de cana-de-açúcar. Há poucos relatos de diazotróficas do gênero *Pseudomonas*, entre estes estão às espécies *P. fluorescens* e *P. putida* observadas neste estudo e por Chan, et al. (1994). Entretanto, não há relato na literatura de *P. mucidolens* como diazotrófica ou de espécies do gênero *Cedecea* e *Microbacterium*. As espécies de *Methylobacterium* são encontradas em solos e superfícies de folhas de uma grande variedade de plantas (Corpe, 1985). Existem poucos relatos do grupo das *Metilotróficas*, do qual o gênero *Methylobacterium* está inserido, como diazotróficos. Auman et al., (2001) observaram os gêneros *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylocystis* e *Methylosinus* pertencentes as *Metanotróficas* contendo o gene *nif H*. Sy et al., (2001), observaram uma nova espécie, *Methylobacterium nodulans*, formando nódulos e fixando nitrogênio em *Crotalaria*. O gênero *Methylobacterium* pertence à Ordem *Rhizobiales*, mas à Família *Methylobacteriaceae*, mostrando filogenia com a família *Rhizobiaceae*. Espécies de *Methylobacterium* têm sido isoladas como endófitos de

citrus (Araújo, 2000), arroz (Abdoulaye et al., 2001) e milho (McInroy e Kloepper, 1995).

A espécie *O. anthropi* foi isolada por Costa (2003) em meio NFb da rizosfera de *Opuntia ficus-indica*. Devido à observação de bactérias endofíticas diazotróficas sem a formação de nódulos, considerável interesse tem sido dedicado a esse nicho para a determinação de como esses endófitos colonizam os tecidos internos das plantas. Contudo, há relativamente pouca informação sobre esse assunto, e mais estudos devem ser conduzidos para elucidar a forma e o local de colonização para atividade de fixação de nitrogênio dentro das plantas (Adachi, et al., 2002).

4.3.1.2 - Presença de gene *nifH*

Quanto à presença do gene *nif H* foram testadas 44 linhagens bacterianas pertencentes às quatro localidades. A amplificação por PCR do gene *nif H* foi observada em 23 linhagens (Tabela 11). As linhagens com o gene *nif H* foram isoladas de plantas coletadas nas quatro localidades, sendo que a maior porcentagem foi obtida para os isoaldos de plantas de coletadas em Lins (Figura 8).

As linhagens positivas pertencem aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Bacillus*.. Houve a observação de mais de uma espécie

positiva somente para o gênero *Pseudomonas*, sendo *P. putida*, *P. stutzeri* e *P. mucidolens*.

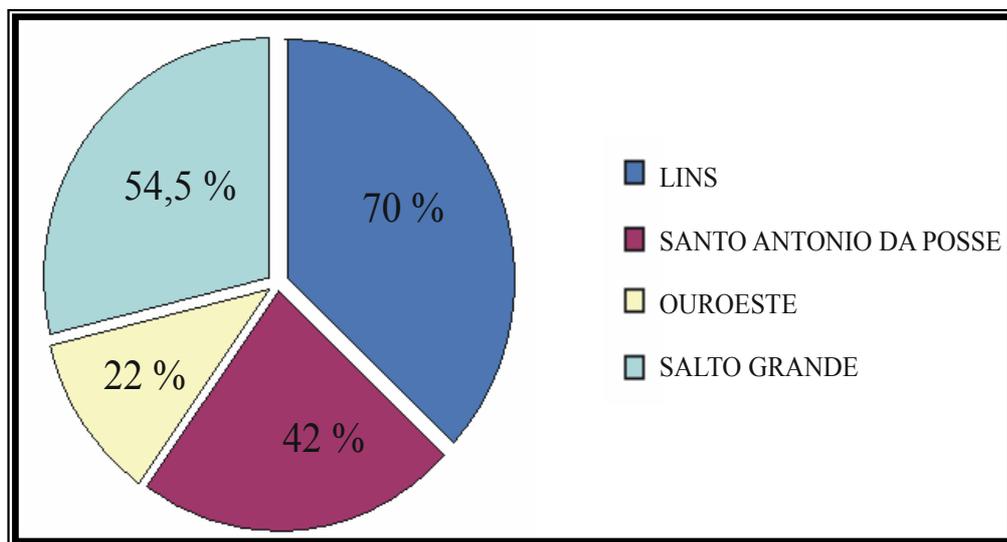


Figura 8 - Porcentagem de isolados endofíticos de raízes de milho com a presença do gene *nif H*

Foi observada discrepância entre a proporção de isolados bacterianos com capacidade para crescer em meio de cultura livre de nitrogênio e isolados que apresentaram reações de PCR positivas para o gene *nif H*. Como as bactérias apresentam diferentes seqüências de nucleotídeos entre e também dentre diferentes espécies microbianas (Zehr et al., 2003), os isolados bacterianos que foram capazes de crescer em meio livre de nitrogênio podem apresentar seqüências diferentes daquelas amplificadas com os *primers* descritos por Ueda et al. (1995).

Tabela 11 – Linhagens bacterianas endofíticas de raízes de milho provenientes de quatro localidades do Estado de São Paulo com a presença do gene *nif H*.

Lins			Ouroeste		
Isolados	Bactérias	<i>Nif H</i>	Isolados	Bactéria	<i>Nif H</i>
7R10/B	<i>Alcaligenes faecalis</i>		16R1	<i>Bacillus lentimorbus</i>	
8R2/A1	<i>S. maltophilia</i>	X	16R3	<i>O. anthropi</i>	X
8R2/B	<i>O. anthropi</i>	X	17R1D	NI	
8R2/C2	<i>Pseudomonas putida</i>	X	17R1D/A	NI	
8R9/A	<i>P. putida</i>	X	17R2A/B	<i>O. anthropi</i>	
9R1/A	<i>O. anthropi</i>	X	17R2D/A	NI	
9R2	<i>P. mucidolens</i>	X	17R2D/C	<i>P. stutzeri</i>	X
9R2/A2	<i>S. maltophilia</i>		18R1B/A	<i>Cedecea lapagei</i>	
9R11	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		18R3B	NI	
12R1/B	<i>O. anthropi</i>	X			
12R2D/A	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	X			
12R2/B	NI	X			
12R2D/C	<i>O. anthropi</i>	X			
12R3/A1	<i>Bacillus pumillus</i>				
12R3/B2	<i>S. maltophilia</i>	X			
12R8	<i>Klebsiella pneumoniae-</i>	X			
12R9	NI				
Santo Antonio Posse			Salto Grande		
13R1C	<i>E. sakazakii</i>	X	19R1C/B	<i>O. anthropi</i>	X
14R1C/B	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>		19R2A/B	NI	X
14R1E/A	NI	X	19R2A/E2	<i>S. maltophilia</i>	X
14R1F	NI		19R2D	<i>E. agglomerans</i>	
14R2A	<i>Gluconobacter asaii</i>		19R3C	NI	
15R1A/C	<i>Bacillus cereus</i>	X	19R3F	NI	
15R2B	<i>P. putida</i>		19R3G/A	<i>S. maltophilia</i>	X
			19R3G/C	<i>Bacillus cereus</i>	X
			20R1A	<i>S. maltophilia</i>	X
			20R1G	NI	
			20R2B	NI	

X = presença gene *nif H*

NI = Não Identificada

As linhagens que apresentaram esse comportamento foram *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumillus*, os isolados 12R9, 14R1F, 18R3B, *Alcaligenes xylosoxydans*, *Cedecea lapagei* e *Sphingobacterium multivorum*.

Algumas bactérias não foram capazes de crescer em meio de cultura livre de nitrogênio, entretanto apresentaram reação de PCR positiva para o gene *nif H*. Isto ocorreu com linhagem *B. cereus* e o isolado 12R2B. Nestes casos, as bactérias podem não ter encontrado as condições adequadas para a expressão da atividade da nitrogenase, sendo assim, o operon *nif HDK* não é expresso constitutivamente e é regulado em resposta a fatores que controlam a fixação do N₂ (Zehr et al., 2003).

Um desses fatores pode ser a fonte de carbono utilizada. Ocorre que diazótrofos facultativos e microaerofílicos fixam nitrogênio na presença de oxigênio apenas se sua respiração os capacita a reduzir seu nível no meio. Nestes organismos a respiração desempenha função protetora da nitrogenase aos danos causados pelo oxigênio. Em Azobactérias a respiração remove o oxigênio do sítio de fixador do dinitrogênio. *A. chroococcum* é particularmente versátil em ajustar sua taxa respiratória ao suprimento de oxigênio, uma cultura em crescimento pode dobrar sua taxa respiratória em cerca de 20 minutos com o aumento de oxigênio. Uma consequência é que enormes quantidades de carbono precisam ser consumidas para remover o oxigênio. Por

exemplo, *A. chroococcum* consome em média 1 g de açúcar para fixar 10 a 15 mg de N, e na falta de oxigênio produz até 45 mg de N para cada grama de açúcar (Postgate, 1989). Devido ao fato de um grande número de linhagens terem sido testadas, utilizou-se um único meio de cultura, o que provavelmente não ofereceu as condições necessárias para cada linhagem testada. Shaffer et al. (2000) citou a possível relação entre os habitats das bactérias fixadoras de nitrogênio e a estrutura do gene *nif H*.

Neste estudo o total de linhagens endofíticas diazotróficas, considerando-se o crescimento em NFb e a presença do gene *nif H* é alto em relação ao número de isolados analisados.

Gyaneshwar et al. (2001) relataram que as bactérias diazotróficas de raízes e caules representaram somente 10 % do total de bactérias com crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio em cinco variedades de arroz. Costa (2003) observou em cactácea coletada nos Estados de Alagoas, Paraíba e São Paulo 10 linhagens com a presença do gene *nif H*, sendo apenas uma linhagem endofítica e em mandioca coletada nos Estados do Amazonas, Bahia e em São Paulo foram observadas apenas 8 linhagens endofíticas positivas (Teixeira, 2004).

Além deste estudo, Teixeira (2004) também observou o gene *nif H* na espécie *S. maltophilia*, sendo que Ramos (2002) havia observado apenas o gênero *Stenotrophomonas*. Na literatura parece não haver relatos de gene *nif H* em *O. anthropi*. O gênero *Enterobacter* é citado

como diazotrófico em diferentes espécies de plantas (Bilal et al., 1990, Mukhopadhyay et al., 1996, Mehnaz et al., 2001).

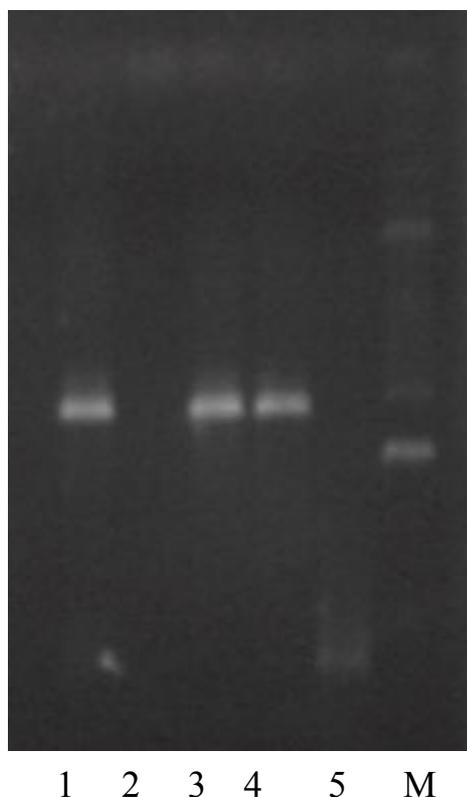


Figura 9 – PCR específico para o gene *nif H*. M – Marcador 100 pb; 1,2,3,4,5, isolados endofíticos.

Já *Klebsiella pneumoniae* tem sido extensivamente estudada com relação a caracterização e regulação dos genes *nif*, sendo 20 no total nessa espécie (Dixon e Postgate, 1972; Streicher, 1972), incluindo o gene *nif H*. Essa espécie já foi citada como endofítica de milho (McInroy e Kloepper, 1995; Palus et al., 1996) e apresentando o gene *nif H* (Palus et al., 1996; Chelius e Triplett, 2000). Como já foi comentado anteriormente o gênero *Bacillus* tem sido citado como diazotrófico em

várias culturas. Achouak et al. (1999) compararam a filogenia de genes *nif H* na Família *Bacillaceae*.

4.3.2 – Seleção de bactérias produtoras de ácido indol-acético

Para a seleção de bactérias produtoras de AIA foram testados 90 isolados bacterianos, resultando em 45 linhagens com a capacidade de produção desse hormônio. Um total de 54,4% das bactérias endofíticas, isoladas de raízes avaliadas pelo método rápido, em membranas de nitrocelulose, foram positivas para a síntese de AIA via L-triptofano (Figura 10 e 11). Do total de isolados AIA positivos testados em cada localidade, os isolados de plantas coletadas em Lins representaram 87 %, de Santo Antonio da Posse 67 %, de Ouroeste, 72,7 % e de Salto Grande 80 %. Entre as bactérias endofíticas de raízes de milho, produtoras de AIA, *Pseudomonas putida*, *Ochrobactrum anthropi*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus* sp (Figura 12) foram as mais frequentes.

As espécies com alta produção de AIA neste trabalho podem ser consideradas super produtoras, destacando-se *Ochrobactrum anthropi*, *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. lentimorbus*, *Methylobacterium mesophilicum*, bem como alguns isolados não identificados (Tabela 12).



Figura 10- Seleção da capacidade de produção de AIA utilizando membrana: o resultado positivo é indicado pela cor rosa.



Figura 11 - Quantificação de AIA utilizando o reagente de salkowski: diferentes tons de rosa na quantificação de AIA. O tom rosa escuro evidencia a maior concentração de AIA. Amostra **1** -16R3 ; **2** – 12R3/B2.

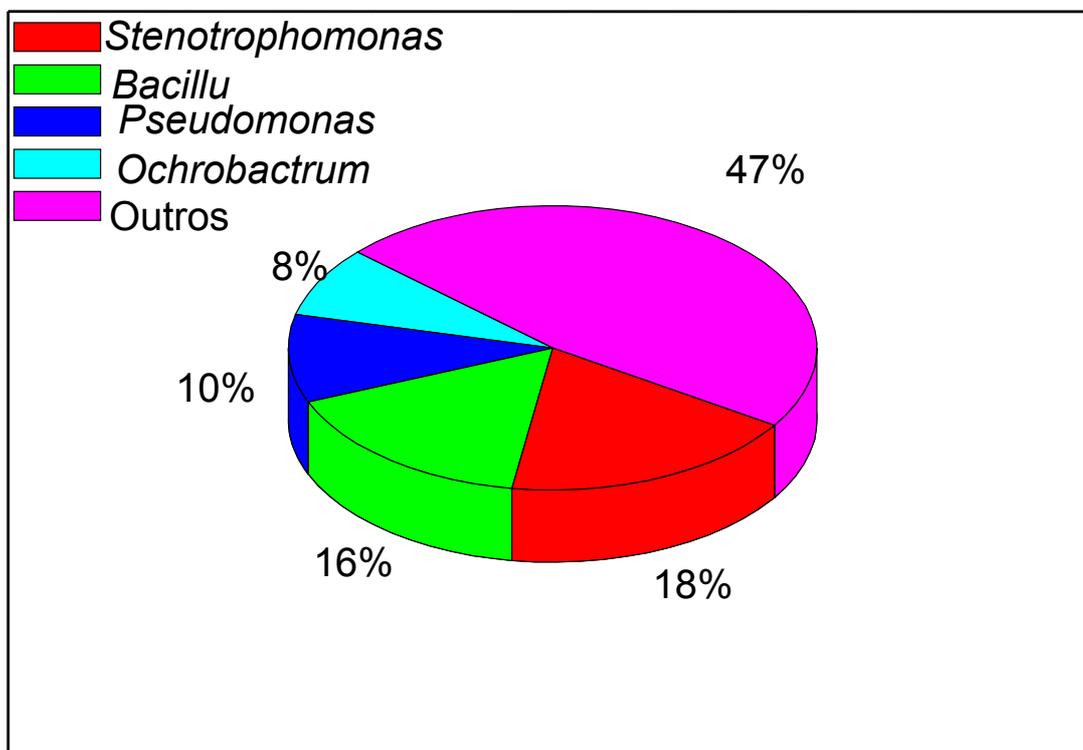


Figura 12 – Porcentagem de gêneros bacterianos endofíticos de raízes de milho produtores de AIA mais representativos.

Diversos trabalhos têm identificado linhagens bacterianas produtoras de AIA, a saber: Verma, et al. (2001) com valores de 0,16-0,70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Xie *et al.* (1996), com valores de 2,0-8,28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Fuentes-Ramirez et al. (1993) com valores de 0,14-2,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e Fett, et al. (1987) com valores de 0,22-6,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, portanto, a maioria dos relatos na literatura citam valores abaixo dos encontrados neste trabalho. Entretanto, poucos trabalhos têm demonstrado a produção de AIA por bactérias endofíticas em geral, e principalmente associadas com milho.

A espécie *Pseudomonas putida* tem sido observada como uma super produtora de AIA, com níveis de AIA de 14,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Trp; 22,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com 100 de Trp e 26,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com 220 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Trp (Patten e Glick, 2002).

Tabela 12 – Linhagens bacterianas endofíticas de raízes de milho produtoras de AIA

LINS								
Código	AIA µg.mL ⁻¹	Identificação	Código	AIA µg.mL ⁻¹	Identificação	Código	AIA µg.mL ⁻¹	Identificação
7R9	2.63	<i>B. megaterium</i> GC A	8R9/B	3.34	<i>S. maltophilia</i>	10R1/A	1.6	<i>Bacillus subtilis</i>
7R10/A	2.72	<i>S. maltophilia</i>	9R1/A	18.59	<i>O.anthropi</i>	10R1/B	3.5	<i>S. maltophilia</i>
8R2/A1	2.0	<i>S. maltophilia</i>	9R1/B	1.90	<i>Bacillus lentimorbus</i>	12R1/A1	2.5	Não identificada
8R2/A2	2.88	<i>Alcaligenes xylosoxydans-xylosoxydan</i>	9R2	4,53	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	12R1/A2	4.76	<i>Enterobacter agglomerans</i>
8R2/B	12.55	<i>O. anthropi</i>	9R4	3.34	Não identificada	12R1/B	8.96	<i>O. anthropi</i>
8R2/C1	3.35	<i>Enterobacter agglomerans</i>	9R4/B	1.39	<i>Paenibacillus macerans</i>	12R2/A	1.86	<i>M.mesophilicum</i>
8R2/C2	11.37	<i>P. putida</i> A	9R4/C	5.07	<i>Comamonas acidovorans</i>	12R2/C	18.22	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
8R9/A	14.0	<i>P. putida</i> biotipo A	9R8	14.9	<i>Bacillus megaterium</i> A	12R3/A1	2.97	<i>Bacillus pumillus</i>
8R9/A2	14.7	<i>S. maltophilia</i>	9R11	7.46	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	12R3/B2	4.72	<i>S. maltophilia</i>
						12R8	9.4	<i>Klebsiella pneumoniae-pneumoniae</i>
Santo Antonio da Posse			Ouroeste			Salto Grande		
Código	AIA µg.mL ⁻¹	Identificação	Código	AIA µg.mL ⁻¹	Identificação	Código	AIA µg.mL ⁻¹	Identificação
13R1C	1.2	<i>E. sakazakii</i>	16R1	8.88	<i>B. lentimorbus</i>	19R1A	10	Não identificada
13R2A/B	2.0		16R3	8.95	<i>O. anthropi</i>	19R3G/A	1.88	<i>S. maltophilia</i>
13R2C	1.29	<i>B. sphaericus</i>	17R1A	13.33	Não identificada	19R3G/B	3.14	<i>S. maltophilia</i>
14R1C/B	2.12	<i>Alcaligenes faecalis</i>	17R1D/A	3.67	Não identificada	19R3G/C	2.86	<i>Bacillus cereus</i> GC. B
14R1E/A	6.0	Não identificada	17R2D	1.0	Não identificada			
14R1E/C	2.40	<i>S. maltophilia</i>	18R3A	1.50	Não identificada			
14R3A	7.25	<i>Microbacterium saperdae</i>						

* valores de AIA em negrito são acima ou semelhante ao valor do controle

A quantidade de Trp pode ter sido responsável pelos menores valores obtidos para estas linhagens, pois, cada linhagem tem uma concentração ótima de Trp, produzindo quantidades menores de AIA com valores de Trp abaixo ou acima dessa concentração (Bar e Okon, 1993). Entretanto, Xie *et al.* (1996) num estudo anterior com essa mesma linhagem de *P. putida* isolada do ártico, obteve apenas 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Trp no meio. Um outro fator que interage na produção de AIA é o recurso de carbono (C) e a quantidade do mesmo, como o que ocorre na fixação de nitrogênio (Ramirez-Fuentes *et al.*, 1993). Bastián *et al.* (1998) observaram diferenças nos valores de AIA produzidos pela espécie *Acetobacter diazotrophicus* quando diferentes quantidades de sacarose foram adicionadas ao meio de cultura. A produção de AIA foi de 32 ng.mL^{-1} para 100 g de sacarose, de 21 ng.mL^{-1} para 150 g de sacarose, e não foi observada a presença de AIA quando 50 g de sacarose foi utilizada.

Os gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* têm sido observados como produtores de AIA em vários estudos. O gênero *Bacillus* foi observado sintetizando AIA por Halda-Alija (2004). Os gêneros *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Microbacterium*, *Methylobacterium* e *Comamonas* não têm sido observados como produtores de AIA na literatura. Diversos trabalhos Mehnaz *et al.* (2001), Verma, *et al.* (2001), Xie *et al.* (1996), Ramirez-Fuentes- *et al.* (1993) e Fett, *et al.* (1987) têm

identificado linhagens bacterianas produtoras de AIA, todavia, a maioria com níveis abaixo dos encontrados neste trabalho.

Neste trabalho observou-se também que uma mesma espécie isolada de várias localidades produziu quantidades diferentes do hormônio AIA, demonstrando que as mesmas podem ser consideradas linhagens diferentes da mesma espécie como pode ser observado na Tabela 18.

O AIA bacteriano é obtido na fase estacionária de crescimento dos microrganismos, pois é um metabólito secundário, entretanto, a duração da fase de crescimento depende de cada espécie. Assim, para se conhecer o comportamento de crescimento de cada espécie é necessário obter uma curva de crescimento (densidade de células em relação ao tempo), ou realizar a leitura da auxina em vários horários diferentes, encontrando assim o melhor para a obtenção da auxina. Devido ao grande número de bactérias capazes de sintetizar a auxina AIA neste trabalho, não foi possível o ajuste da leitura a fase estacionária, bem como a obtenção da curva de crescimento de cada espécie.

Além do conhecimento da fase estacionária para leitura da auxina, a curva de crescimento fornece a relação entre a densidade bacteriana e a produção. A Figura 13 mostra a produção de AIA em relação ao tempo das espécies *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes faecalis*,

Stenotrophomonas maltophilia, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas putida* e *Microbacterium saperdae*.

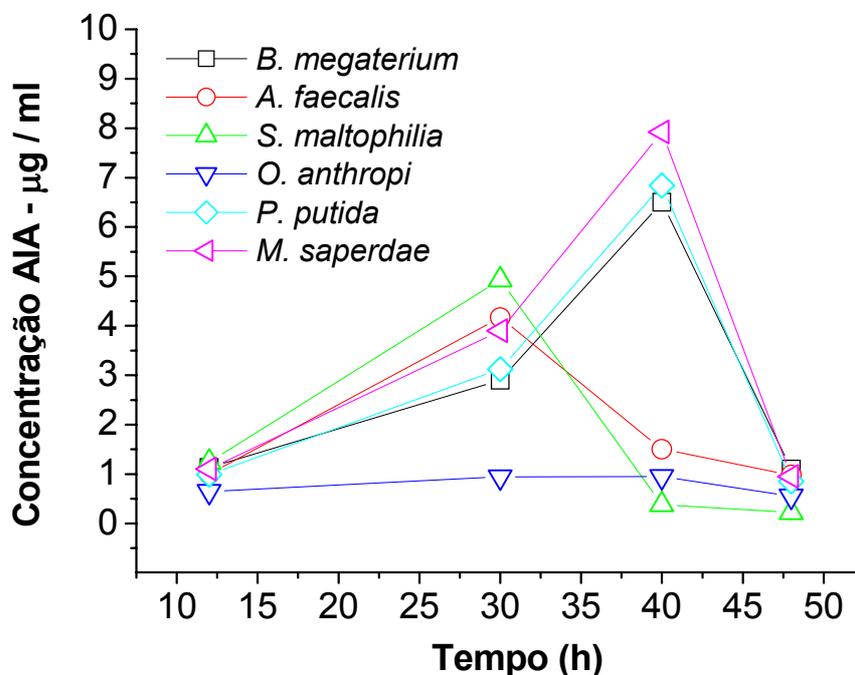


Figura 13 - Curva da produção de AIA de bactérias endofíticas de raízes de milho de diferentes localidades

As curvas da produção de AIA obtidas, provavelmente não refletem a realidade da produção de AIA com relação ao tempo das bactérias endofíticas analisadas, pois o crescimento apresentado das espécies testadas não foi ótimo como observado anteriormente neste trabalho. A grande maioria das linhagens mantidas em estoque apresentou crescimento lento, produção menor de biomassa ou falta de crescimento durante o ano de 2004. Isso indica que muitas bactérias podem ter perdido ou reduzido a atividade devido a repetidas repicagens em meio de cultura. As razões para isso não são claras (Gyaneshwar et

al., 2001). Esse fato pode ser observado através dos valores de AIA obtidos na curva, os quais foram $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $4,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $4,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $7,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, para as espécies testadas, diferindo dos valores obtidos nos experimentos anteriores.

4.3.3 - Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato

Um total de 43 isolados foi testado quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, sendo que apenas as linhagens 12R4/B e 14R3B foram negativas (Tabela 13). O maior número de linhagens com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico foi observado em plantas coletadas em Lins, com 19 linhagens representando 46,3%. Esse fato pode ser devido ao maior número de plantas coletadas e ao maior número de isolados identificados provenientes deste local.

A solubilização de fosfato foi observada nos gêneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Sphingobacterium*, *Ochrobactrum*. Na literatura existem vários relatos de solubilização de fosfato pelos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus* e alguns por *Klebsiella*. Entretanto, não há ocorrência de relatos com os gêneros *Stenotrophomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingobacterium* e *Ochrobactrum*.

Tabela 13 – Bactérias endofíticas capazes de solubilizar fosfato

LINS			OUROESTE		
Isolados	Identificação	Fosfato	Isolados	Identificação	Fosfato
8R1	<i>B. pumillus</i>	+	16R3	<i>O. anthropi</i>	+
8R9/A	<i>S. maltophilia</i>	+	16R3/A	NI	+
8R9/B	<i>S. maltophilia</i>	+	17R1A	NI	+
8R13	NI	+	17R1B	NI	+
9R4	NI	+	17R1C	NI	+
9R4/B	<i>Paenibacillus macerans</i>	+	17R2D/A	NI	+
9R8	<i>B. megaterium</i>	+	17R2A/B	NI	+
9R11	<i>M. sesophilicum</i>	+	17R2F	<i>O. anthropi</i>	+
12R2/B	NI	+	18R1C	NI	+
12R3/A1	<i>B. pumillus</i>	+	18R3B	NI	+
12R3/B	NI	+			
12R3/B2	<i>S. maltophilia</i>	+			
12R4	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	+			
12R4/A	NI	+			
12R4/B	NI	-			
12R6	NI	+			
12R8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+			
SANTO ANTONIO POSSE			SALTO GRANDE		
Isolados	Identificação	Fosfato	Isolados	Identificação	Fosfato
13R1C	<i>E. sakazakii</i>	+	19R1A	NI	+
13R2A	<i>P. putida</i>	+	19R1C	NI	+
13R2B	NI	+	19R3B	<i>P. putida</i>	+
14R1C/B	<i>A. faecalis</i>	+	19R3F	NI	+
14R1E/A1	NI	+	20R1A	<i>S. maltophilia</i>	+
14R3A	<i>M. saperdae</i>	+	20R3E	NI	+
14R3B	NI	-			

Devido ao grande número de linhagens isoladas neste trabalho, não foi possível a conclusão de todos os testes para todas as linhagens. A Tabela 14 apresenta o resultado de todos os testes realizados. Não foi possível a identificação pelo MIDI de alguns isolados, devido à falta de crescimento no meio de cultura TSBA, condição esta imprescindível para a análise e comparação dos ácidos graxos celulares.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o grande potencial das bactérias endofíticas de milho, pois 72 linhagens foram positivas para pelo menos um dos mecanismos de promoção de crescimento, além disso, várias linhagens foram positivas para mais de um desses mecanismos. Estes dados estão de acordo com os obtidos em alguns estudos que indicam um potencial maior dos endófitos na promoção de crescimento em relação aos microrganismos rizosféricos (Reiter t al., 2002).

Tabela 14 - Linhagens endofíticas de milho (*Zea mays*) que apresentaram positividade para um ou mais dos testes realizados, porcentagem de similaridade obtida na identificação pelo MIDI e local de isolamento.

Bactérias	Identificação	MIDI %	AIA $\mu\text{g/ml}^{-1}$	Fosfato	NFb	Nif H	Local
7R3/A	<i>P. fluorescens</i> B	0,896	-	NT	+	NT	Lins
7R9	<i>Bacillus megaterium</i> GC A	0,632	2.63	NT	+	NT	Lins
7R10/A	<i>S. maltophilia</i>	0,621	2.72	NT	+	NT	Lins
7R10/B	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,830	NT	NT	NT	-	Lins
8R1	<i>Bacillus pumillus</i> GC B	0,596	-	+	+	NT	Lins
8R2/A1	<i>S. maltophilia</i>	0,711	2.0	NT	+	+	Lins
8R2/A2	<i>Alcaligenes xylosoxydans-xylosoxydan</i>	0,902	2.88	NT	+	NT	Lins
8R2/B	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,840	12.55	NT	+	+	Lins
8R2/C1	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,845	3.35	NT	NT	NT	Lins
8R2/C2	<i>Pseudomonas putida</i> A	0,850	11.37	NT	+	NT	Lins
8R9/A	<i>P. putida</i> biotipo A	0,814	14.0	+	+	+	Lins
8R9/A2	<i>S. maltophilia</i>	0,628	14.7	NT	+	NT	Lins
8R9/B	<i>S. maltophilia</i>	0,838	3.34	+	NT	NT	Lins
8R15	<i>B. megaterium</i>	0,752	-	NT	+	NT	Lins
9R1/A	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,865	18.59	NT	+	+	Lins
9R1/B	<i>Bacillus lentimorbus</i>	0,604	1.90	NT	+	NT	Lins
9R2	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	0,633	4.53	NT	+	-	Lins
9R2/A2	<i>S. maltophilia</i>	0,610	NT	NT	+	-	Lins
9R4	Não foi identificada.	--	3.34	+	NT	NT	Lins
9R4/A	Não foi identificada	--	NT	+	+	NT	Lins
9R4/B	<i>Paenibacillus macerans</i>	0,507	1.39	+	NT	NT	Lins
9R4/C	<i>Comamonas acidovorans</i>	0,667	5.07	NT	NT	NT	Lins
9R8	<i>Bacillus megaterium</i> A	0,650	14.9	+	+	NT	Lins

9R9	<i>Sphingobacterium faecium</i>	0,601	NT	NT	+	NT	Lins
9R9/B	Não encontrada na TSBA 50	--	NT	NT	NT	NT	Lins
9R11	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> GC A	0,845	7.46	+	+	-	Lins
10R1/A	<i>Bacillus subtilis</i>	0,787	1.6	NT	NT	NT	Lins
10R1/B	<i>S. maltophilia</i>	0,705	3.5	NT	+	NT	Lins
12R1/A1	Não encontrada na TSBA 50	--	2.5	NT	NT	NT	
12R1/A2	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,711	4.76	NT	+	NT	Lins
12R1/B	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,780	8.96	NT	-	+	Lins
12R2/A	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	0,881	1.86	NT	+	+	Lins
12R2/B	Não foi identificada.	--	NT	+	-	+	Lins
12R2/C	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,802	18.22	NT	+	+	Lins
12R3/A1	<i>Bacillus pumillus</i> GC B	0,703	2.97	+	+	-	Lins
12R3/B	Não foi identificada.	--	-	+	+	NT	Lins
12R3/B2	<i>S. maltophilia</i>	0,701	4.72	+	NT	-	Lins
12R4	<i>Alcaligenes xylosoxydans-xylosoxydans</i>	0,867	-	+	+	NT	Lins
12R4/A	<i>Klebsiella pneumoniae-pneumoniae</i>	0,776	NT	+	NT	NT	Lins
12R6/A	<i>B. cereus</i>	0,802	-	NT	NT	NT	Lins
12R8	<i>Klebsiella pneumoniae-pneumoniae</i>	0,827	9.4	+	+	NT	Lins
12R9	Não foi identificada.	--	NT	NT	+	-	Lins
13R1C	<i>Enterobacter sakazakii</i>	0,615	1.2	+	NT	-	Sto A Posse
13R2A	<i>Pseudomonas putida</i> biotipo A	0,709	-	+	+	NT	Sto A Posse
13R2C	<i>Bacillus sphaericus</i>	0,734	1.29	+	-	NT	Sto A Posse
13R2C/A	Não identificada	--	NT	NT	+	NT	Sto A Posse
14R1C/A	Não encontrada na TSBA 50	--	NT	NT	NT	NT	Sto A Posse
14R1C/B	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,911	2.12	+	NT	-	Sto A Posse
14R1E/A	<i>Microbacterium saperdae</i>	0,532	6.0	+	+	+	Sto A Posse
14R1E/B	Não foi identificada	--	-	NT	NT	NT	Sto A Posse
14R1E/C	<i>S. maltophilia</i>	0,843	2.40	NT	+	NT	Sto A Posse
14R2A	<i>Gluconobacter asaii</i>	0,506	-	NT	NT	-	Sto A Posse
14R3A	<i>Microbacterium saperdae</i>	0,619	7.25	+	+	NT	Sto A Posse
14R3C	<i>S. maltophilia</i>	0,730	NT	NT	NT	NT	Sto A Posse
15R1A/C	<i>B. cereus</i>	0,830	NT	NT	+	+	Sto A Posse
15R1G/B ₁	<i>S. maltophilia</i>	0,640	NT	NT	NT	NT	Sto A Posse
15R1G/B ₂	<i>Pantoea agglomerans</i> GC C (Enterobacter)	0,869	NT	NT	+	NT	Sto A Posse
15R2B	<i>P. putida</i>	0,670	NT	NT	+	-	Sto A Posse
16R1	<i>Bacillus lentimorbus</i>	0,539	8.88	NT	+	NT	Ouroeste
16R3	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,829	8.95	+	+	+	Ouroeste
17R1A	Não encontrada na TSBA 50	--	13.33	+	+	NT	Ouroeste
17R1D/A	Não encontrada na TSBA 50	--	3.67	NT	+	-	Ouroeste
17R2A/B	<i>O. anthropi</i>	0,869	-	+	NT	-	Ouroeste
17R2D	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,914	1.0	+	+	NT	Ouroeste
17R2D/A	Não foi identificada	--	NT	+	NT	-	Ouroeste
17R2D/C	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,855	NT		NT	-	Ouroeste
17R2F	<i>O. anthropi</i>	0,726	+	+	+	NT	Ouroeste

18R1b/A	<i>Cedecea lapagei</i>	0,739	-	NT	+	-	Ouroeste
18R1B/A2	Não encontrada na TSBA 50	--	NT	NT	NT	NT	Ouroeste
18R1B/B	<i>Escherichia coli</i> GC B	0,667	NT	NT	-	NT	Ouroeste
18R1C	Não foi identificada	--	-	+	+		Ouroeste
18R3A	Não foi identificada	--	1.50	NT	+	NT	Ouroeste
18R3B	Não foi identificada	--	3.69	+	+	-	Ouroeste
19R1A	Não foi identificada	--	10	+	+	NT	S. Grande
19R1C/A	<i>S. maltophilia</i>	0,546	NT	NT	+	NT	S. Grande
19R1C/B	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,865	NT	NT	NT	+	S. Grande
19R1D/A	<i>S. maltophilia</i>	0,771	NT	NT	+	NT	S. Grande
19R1D/A3	<i>Microbacterium lacticum</i>	0,702	NT	NT	NT	NT	S. Grande
19R2A/B	Não foi identificada	--	NT	NT	+	+	S. Grande
19R2A/A	<i>E. hormaechei</i>	0,653	NT	NT	NT	NT	S. Grande
19R2A/E2	<i>S. maltophilia</i>	0,915	NT	NT	NT	+	S. Grande
19R2C	<i>Yersinia frederiksenii</i>	0,502	NT	NT	+	NT	S. Grande
19R2D	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,652	NT	NT	NT	-	S. Grande
19R2D/A	<i>Bacillus lentimorbus</i>	0,704	NT	NT	NT	NT	S. Grande
19R2D/B	<i>Escherichia coli</i>	0,844	NT	NT	NT	NT	S. Grande
19R3B	<i>P. putida</i> biótipo A	0,637	NT	+	NT	NT	S. Grande
19R3G/A	<i>S. maltophilia</i>	0,650	1.88	NT	+	+	S. Grande
19R3G/B	<i>S. maltophilia</i>	0,642	3.14	NT	+	NT	S. Grande
19R3G/C	<i>Bacillus cereus</i> GC sub. B	0,687	2.86	NT	-	+	S. Grande
20R1A	<i>S. maltophilia</i>	0,811	-	+	+	+	S. Grande
20R1G	Não foi identificada	--	NT	NT	NT	-	S. Grande
20R2C/A	<i>Nestereukonia halobia</i> (<i>Micrococcus</i>)	0,638	NT	NT	NT	NT	S. Grande
20R2C/B	<i>O. anthropi</i>	0,829	NT	NT	+	NT	S. Grande
20R2D/A	<i>B. cereus</i>	0,628	NT	NT	NT	NT	S. Grande
20R2E/A	<i>Kocuria varians</i> GC A (<i>Micrococcus</i>)	0,722	NT	NT	NT	NT	S. Grande

Legenda:

NT = Isolado não testado

Não identificada = devido a falta de crescimento no meio de cultura padrão

A utilização de bactérias produtoras de AIA, ou fixadoras de N₂ atmosférico, ou solubilizadoras de fosfato, seria uma forma inicial de seleção dos endófitos, uma vez que tais características exigem condições adequadas para se manifestarem.

O grupo *Proteobacteria* prevaleceu nas comunidades bacterianas endofítica e a subdivisão gama foi a mais freqüente e com maior diversidade. Este grupo também foi o mais freqüente em milho através de técnicas de análise sem cultivo (Chelius e Triplett, 2001), em mandioca (Teixeira, 1999), e em soja (Sobral, 2003).

Além da diversidade genética, este grupo bacteriano apresentou diversidade fisiológica entre as características com potencial para a promoção de crescimento vegetal avaliadas. Neste grupo, a diversidade fisiológica pode estar relacionada ao genótipo do hospedeiro, condições de cultivo e estágio fenológico, demonstrando que características da planta e dos microrganismos podem estar envolvidas na interação bactéria-planta. Por exemplo, nos isolados de Lins observou-se a maior porcentagem de bactérias produtora de AIA, com a presença do gene *nifH* e solubilizadoras de fosfato. Essas bactérias foram isoladas do cultivar Agroceres AL-25 com 60 e 90 dias com a utilização de Randap e 2-4D (DMA) na superfície do solo antes do plantio, e aplicação de herbicida e inseticida durante o cultivo.

Observou-se uma discrepância entre a proporção de isolados bacterianos com capacidade de crescer em meio de cultura livre de nitrogênio e isolados que apresentaram a reação de PCR positiva para o gene *nifH*. Portanto, as bactérias associadas ao milho que foram capazes de fixar N_2 *in vitro* e não apresentaram o fragmento esperado na reação de PCR podem possuir seqüências diferentes daquelas amplificadas com os primers utilizados. O estudo da diversidade funcional de comunidades microbianas associadas às plantas é enriquecido com o conhecimento da diversidade genética das populações bacterianas avaliadas.

O estudo da diversidade genética e diversidade funcional de bactérias endofíticas em milho são importantes, pois junto com outros estudos como a colonização interna dos tecidos da planta, predominância e estabilidade em vários genótipos e solos, associados aos fatores que influenciam a colonização, pode-se desenvolver sondas de detecção bem como a utilização desses microrganismos como vetores.

A exploração do potencial biotecnológico de um determinado organismo deve envolver uma série de experimentos com variações edafo-climáticas, que procurem maximizar ou comprovar o efeito benéfico do microrganismo analisado. As interações solo-planta-microrganismos são complexas e seus efeitos individuais difíceis de serem estudados. Devido ao pouco conhecimento dos processos interativos entre os microrganismos endofíticos e a planta que colonizam vários experimentos em casa de vegetação e no campo, devem ser realizados para que se possa considerar o maior número possível de fatores como os associados à planta (condições de sanidade, estado nutricional), ao solo (fatores físicos, químicos, microbiológicos e compactação) e às condições climáticas (temperatura ambiental e do solo), dentre outros.

Os isolados selecionados neste trabalho podem ser utilizados também em testes futuros com outras culturas. Gomes et al. (2003) demonstraram que duas bactérias, *Bacillus thuringiensis* (C25) e *Bacillus*

pumilus (C116), isoladas de plantas de couve, aumentaram o crescimento de alface cultivada em casa de vegetação.

Bactérias isoladas de uma determinada planta podem, portanto, colonizar hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade e promover o crescimento das mesmas (Quadt-Halman e Kloepper, 1996; Mello et al., 2002).

4.3.4 – Promoção de crescimento de milho

Devido ao fato da quantidade sempre crescente de fertilizantes nitrogenados e fosfatados necessários a produção agrícola, a alta exigência energética para a produção dos mesmos, e ao impacto ambiental provocado pela lixiviação, está se tornando muito importante a tentativa de estender a fixação biológica de nitrogênio a plantas não leguminosas, bem como a utilização da solubilização de fosfato inorgânico de reservas do solo pelas bactérias para as plantas de forma geral. É importante também o entendimento da interação bactéria-planta na produção da auxina AIA e sua utilização no aumento da produção agrícola, além do conhecimento da diversidade de bactérias endofíticas para uma possível utilização das mesmas de várias formas, pois elas estão adaptadas às condições internas das plantas.

Os resultados da produção de auxina, solubilização de fosfato e fixação de N₂ permitiram a seleção de alguns isolados endofíticos para

serem reintroduzidos em sementes e avaliado o potencial de promoção de crescimento em plantas de milho. A Tabela 21 mostra as características testadas para as bactérias que foram utilizadas nos experimentos de promoção de crescimento.

O teste estatístico utilizado foi o teste de Duncan. A análise estatística, indicada pelas letras ABC, quando repetidas nos diferentes tratamentos não apresentam diferença significativa entre os tratamentos.

No experimento I, como pode ser observado na Figura 14, com exceção das bactérias 7R3/A, 14R1C/A e 14R1E, não foi observada diferença significativa entre os vários tratamentos no peso seco das raízes, entretanto os valores de peso seco foram menores do que o do controle. Observa-se na Figura 15 que na parte aérea (Colmo e folhas), apenas a bactéria 14R1E apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos testados, entretanto, o valor do peso seco foi menor do que o controle.

A espécie *Azospirillum brasilense* (BR 11001/Embrapa) é um diazotrófico associado a raízes de milho e a outras gramíneas, tendo sido utilizado como controle positivo. Todavia, sua aplicação não influenciou o crescimento das plantas. A bactéria M3A utilizada neste experimento foi isolada por Lucon (1998), na rizosfera de milho, tendo promovido um aumento na matéria seca das plantas de milho. Neste experimento utilizou-se as bactérias sem o conhecimento da identificação das mesmas, pois não haviam sido realizadas as análises no MIDI.

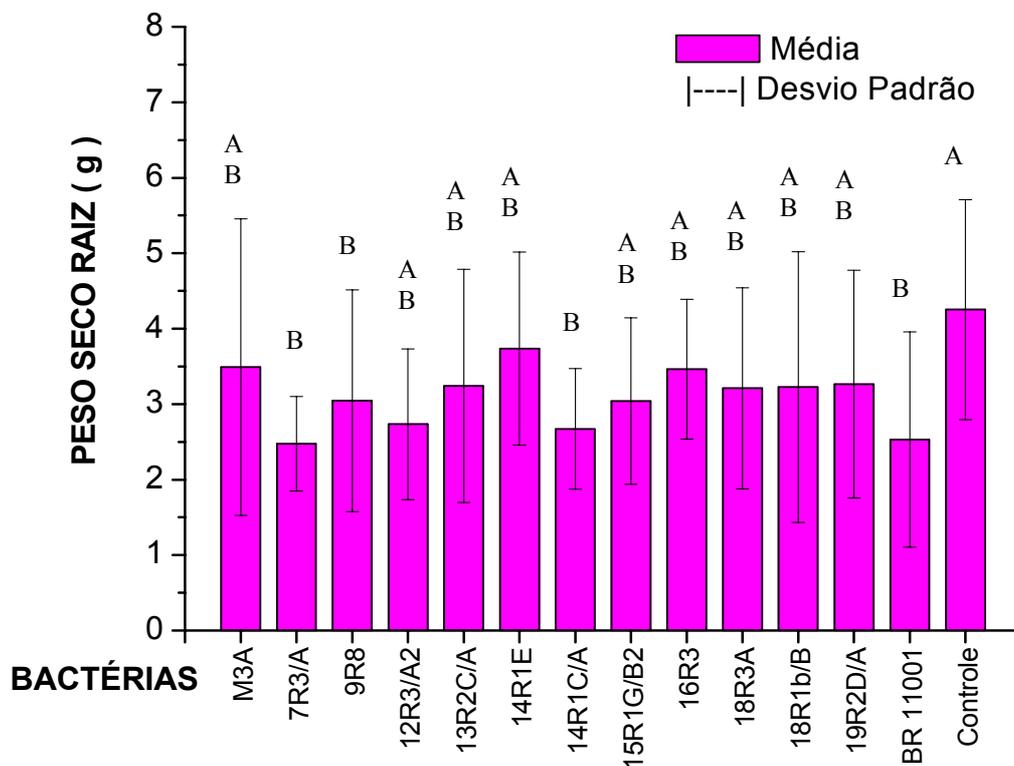


Figura 14 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (experimento I)

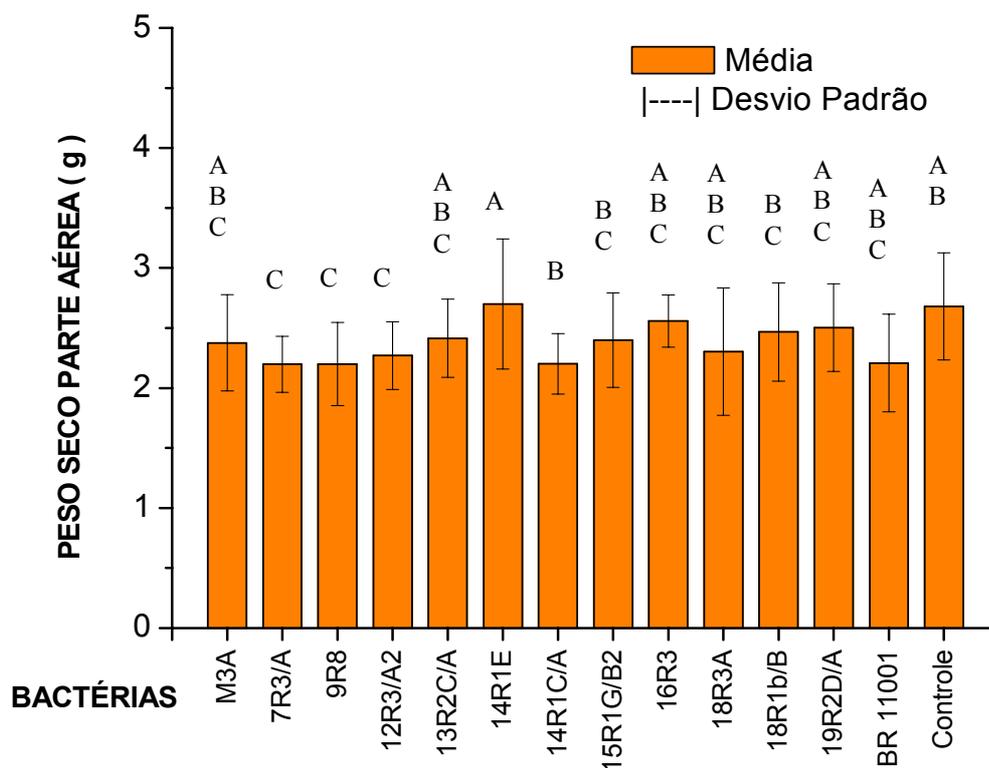


Figura 15 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (experimento I)

A bactéria 18R1B/B, *Escherichia coli*, foi utilizada sem o prévio conhecimento da mesma ser esta espécie.

Nos diferentes testes realizados, algumas bactérias apresentaram resultado negativo, entretanto foram utilizadas, devido ao fato de alguns relatos de aumento no crescimento de plantas através da inoculação de bactérias que não produzem AIA, não fixam nitrogênio e nem solubilizam fosfato inorgânico. Não há informações de como ocorre a promoção de crescimento nestes casos.

No experimento II, apresentado na figura 16, o peso seco das raízes foi maior no controle, quando comparado aos tratamentos com bactérias. Com relação à matéria seca da parte aérea, Figura 17, a linhagem *Klebsiella pneumoniae* proporcionou um aumento de 10% no peso seco em relação ao controle. Não foi observada diferença significativa entre os demais tratamentos. Esta linhagem é capaz de sintetizar AIA ($9,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), de crescer em meio NFb e de solubilizar fosfato. A linhagem OG utilizada neste experimento é *Bacillus subtilis* isolada da rizosfera de feijão cultivado em solo supressivo a podridão radicular seca na região de Guaira/SP.

Sabe-se que os solos brasileiros são deficientes em zinco (Malavolta, 1980) e que vários estudos têm indicado que o milho possui duas rotas de síntese de AIA, uma via triptofano (Glawischnig, et al., 2000) e outra sem o triptofano (Michalczuk et al., 1992; Östin, et al., 1999).

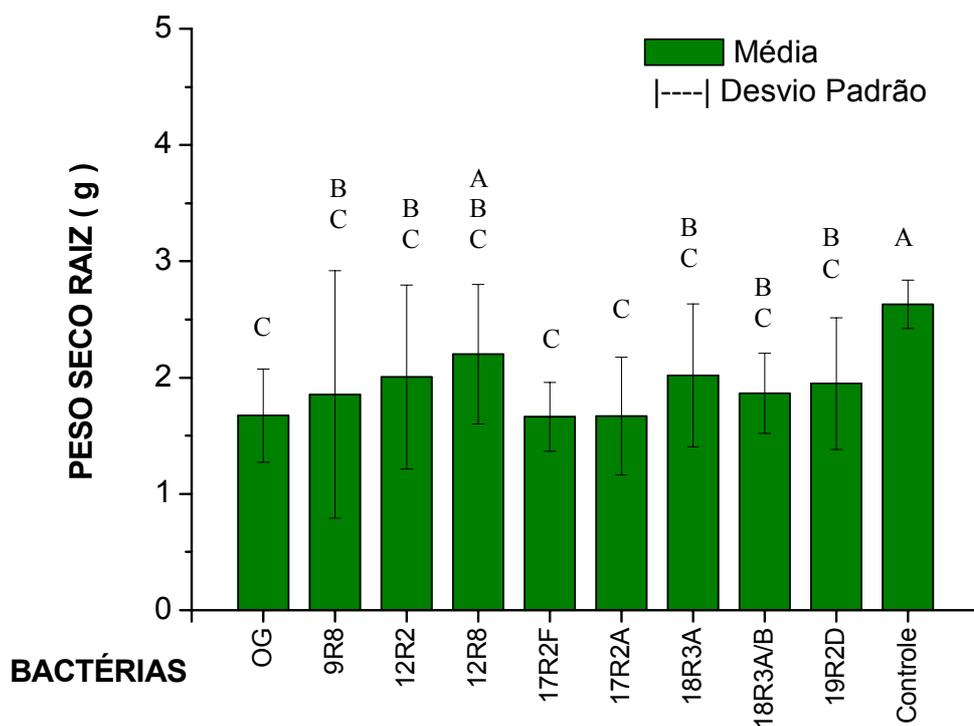


Figura16 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (Experimento II).

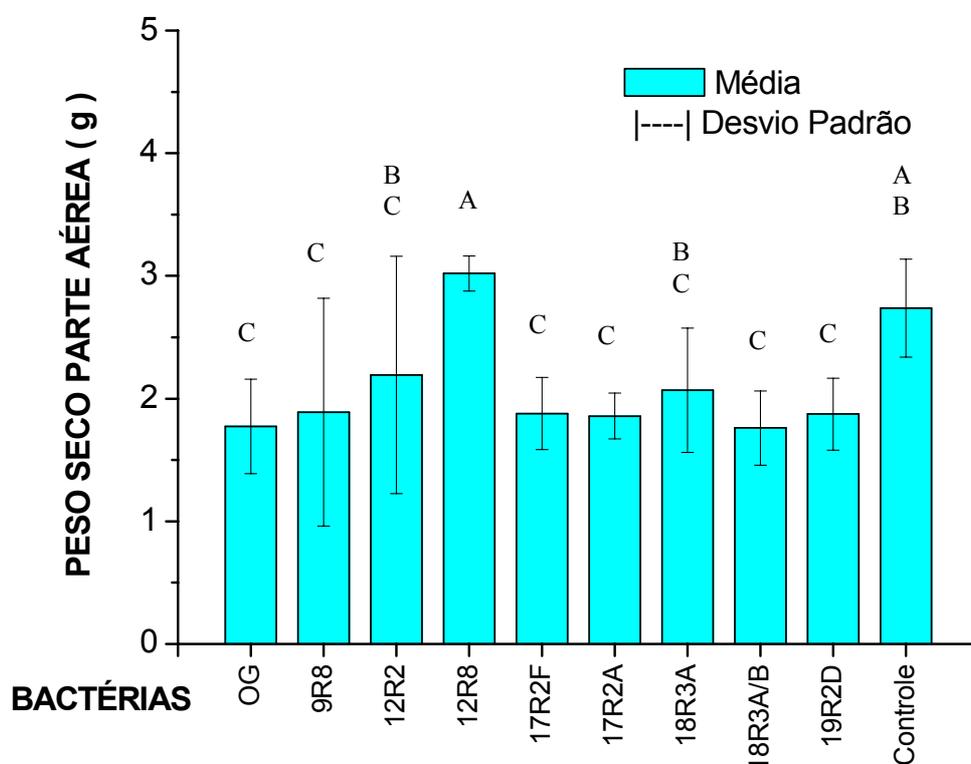


Figura 17 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo esterilizado (experimento II).

Assim, devido ao fato desse mineral ser essencial à síntese do triptofano, que é o precursor do AIA produzido pelas bactérias selecionadas neste trabalho, no experimento III adicionou-se zinco ao preparo do solo.

No experimento III o objetivo foi observar o efeito das bactérias produtoras de AIA em solos sob diferentes formas de tratamento: solo esterilizado e não esterilizado, suplementado com zinco; e solo esterilizado e não esterilizado suplementado com zinco e NPK. A fonte de zinco utilizada nos experimentos foi $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, o qual não precipita no pH 5,8 do solo utilizado nos experimentos, portanto permanecendo disponível. Além disso, foi adicionado NPK, devido à hipótese de que sem condições ideais de nutrição a planta não produziria Trp, sendo assim, este aminoácido não estaria disponível as bactérias para a síntese de AIA. O ensaio em casa de vegetação foi realizado com as bactérias endofíticas produtoras de AIA *Bacillus megaterium* (9R8), *Stenotrophomonas maltophilia* (10R1/B), *Microbacterium saperdae* (14R3A) e *Ochrobactrum anthropi* (16R3).

Observou-se um aumento significativo do peso seco nas raízes de milho em solo esterilizado suplementado com zinco + NPK, quando inoculadas com *Microbacterium saperdae* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Figura 18). O aumento obtido com *Microbacterium saperdae* e *S. maltophilia* foi de 64 % e 23 % respectivamente.

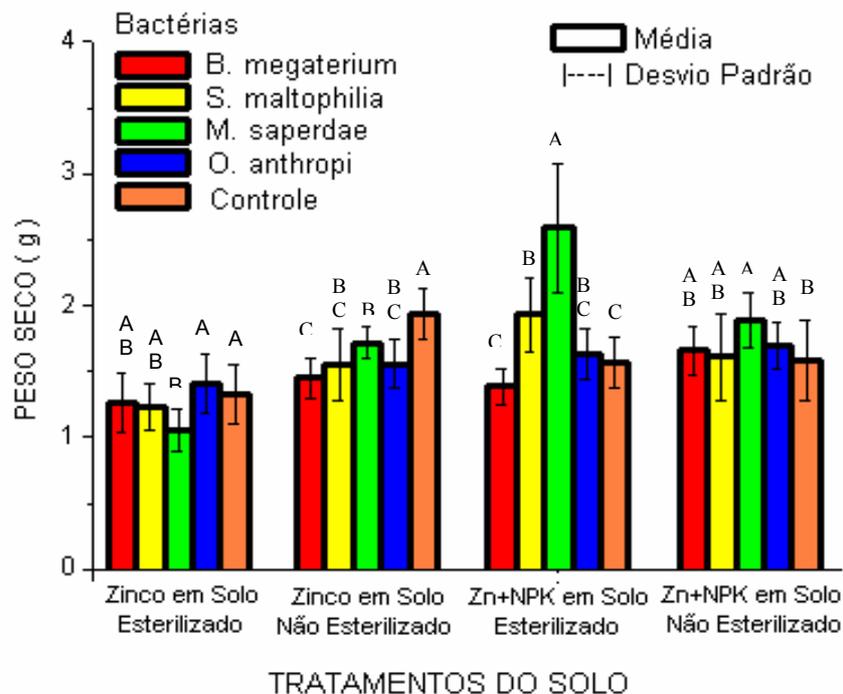


Figura 18 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas de raízes em diferentes condições de tratamento do solo (experimento III). *B. megateium* – 9R8; *S. matophilia* – 10R1/B; *M. saperdae* – 14R3A; *O. anthropi*-16R3.

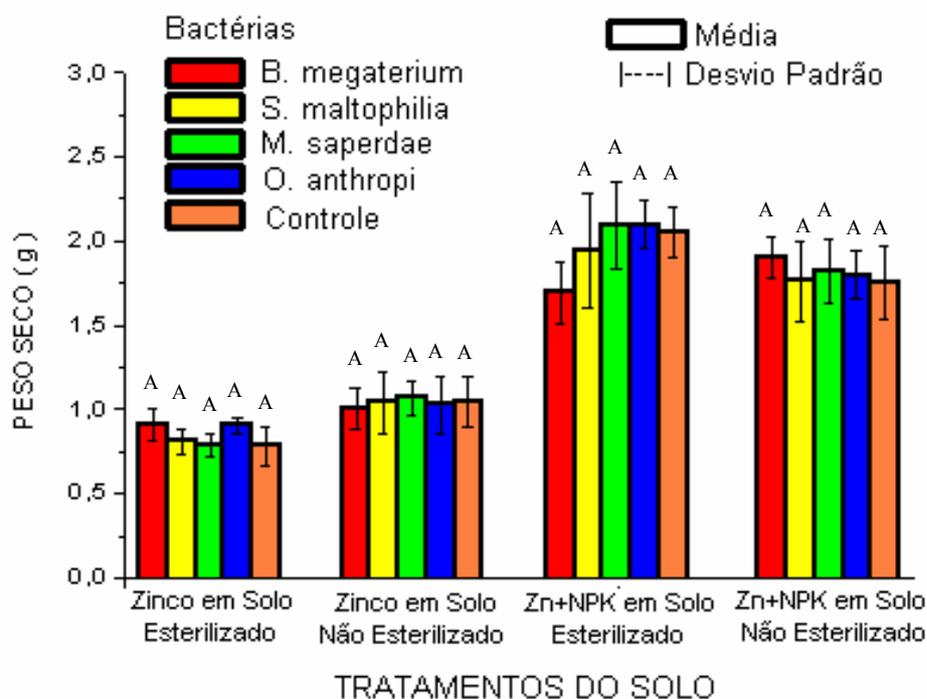


Figura 19 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas de raízes em diferentes condições de tratamento do solo (experimento III). *B. megateium* – 9R8; *S. matophilia* – 10R1/B; *M. saperdae* – 14R3A; *O. anthropi*-16R3.

Em solo não esterilizado suplementado com Zn + NPK, observou-se um aumento nos valores do peso seco com a inoculação das bactérias *Microbacterium saperdae* e *Ochrobactrum anthropi* (Figura 16) de 20 % e de 6 % respectivamente.

Embora em condições de laboratório, o valor de AIA sintetizado por *Ochrobactrum anthropi* tenha sido superior ($8,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aos valores sintetizados por *M. saperdae* ($7,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *S. maltophilia* ($3,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o aumento no peso seco das raízes obtido com *O. anthropi* foi bem menor (6 %). Não houve aumento no peso seco das raízes inoculadas com *Bacillus megaterium*, embora essa bactéria seja capaz de sintetizar $14,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA nas condições oferecidas no laboratório, valor superior ao das bactérias que promoveram aumento de 64 e 23 %.

Nos solos esterilizado e não esterilizado, suplementados apenas com zinco, o peso seco das raízes inoculadas com as demais bactérias foi menor do que o controle, com exceção da bactéria *O. anthropi*, em solo esterilizado, entretanto o aumento não diferiu significativamente.

Na avaliação do peso seco da parte aérea (Figura 19), não foi observado diferença significativa entre os diferentes tratamentos bacterianos e o controle em todos os solos utilizados, embora o peso seco inoculado com *B. megaterium* em solo não esterilizado suplementado com zinco e NPK, tenha sido 15% maior em relação ao peso seco do controle.

Lalande et al. (1989) obteve um resultado semelhante em milho, com aumento no peso seco em plantas tratadas com *Serratia liquefaciens* e *Pseudomonas* sp. de 12%.

No experimento IV foi utilizado solo esterilizado suplementado com zinco e NPK, devido aos resultados positivos obtidos no experimento anterior com relação ao peso seco de raízes. Como pode ser observado na Figura 20, o tratamento com as bactérias *E. cloacae* (17R2D; AIA=1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 17R1A proporcionaram um aumento de 26,9 e 8 %, respectivamente, no peso da matéria orgânica seca das raízes. A análise estatística apontou diferença significativa apenas entre os valores do controle e do tratamento com *E. cloacae*.

Com relação ao peso seco da parte aérea (Figura 21), houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, entretanto, os valores foram menores do que o controle, com exceção da bactéria *Alcaligenes faecalis* (14R1C/B), que apresentou desempenho superior ao controle, porém sem significância estatística. A bactéria *E. cloacae* tem sido relacionada a promoção de crescimento em milho.

No experimento V foi utilizado solo suplementado com Zn e NPK., Figura 21, podendo ser observado que o peso seco das raízes foi maior nos tratamentos com as bactérias *Pseudomonas mucidolens* (AIA = 4,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; NFB +) e *Bacillus megaterium* (AIA=14,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; NFb e Fosfato +).

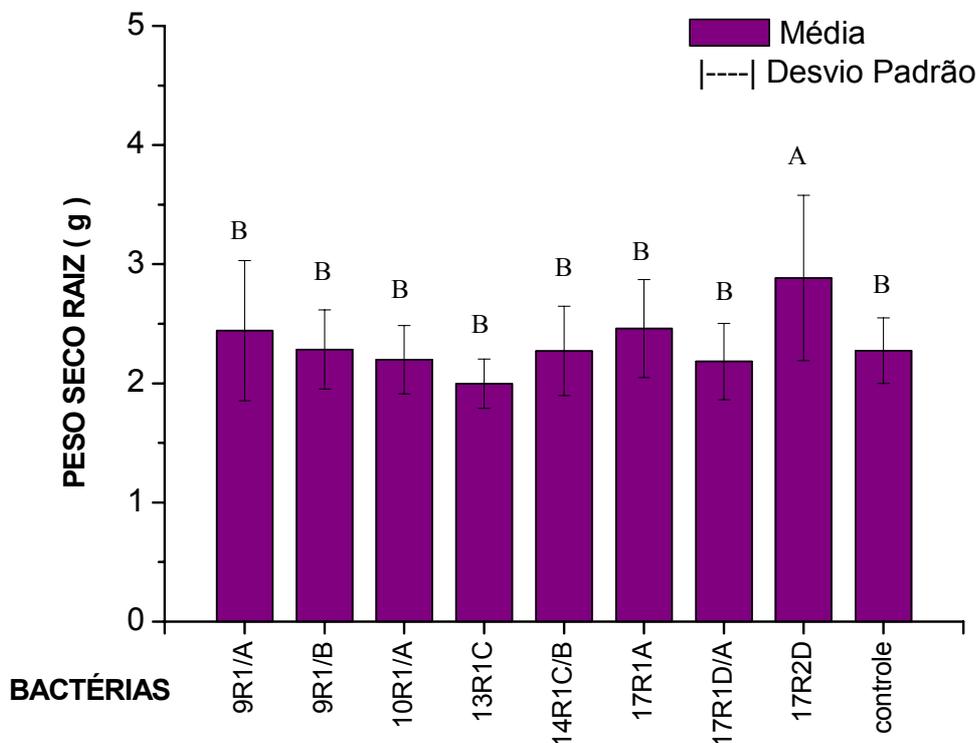


Figura 20 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo com Zn + NPK (experimento IV)

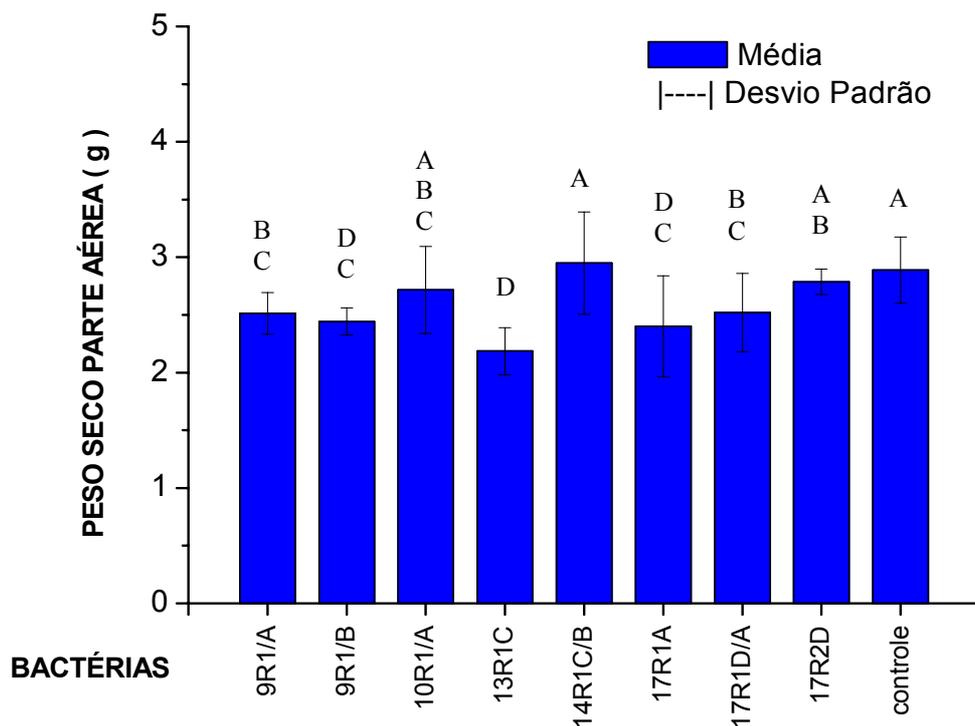


Figura 21 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo com Zn + NPK (experimento IV)

A promoção de crescimento nas raízes com *P. mucidolens* e *B. megaterium* foi de 51% e 20% respectivamente, sendo significativa estatisticamente. Na maioria dos demais tratamentos não houve diferença significativa em relação ao controle.

Na parte aérea (Figura 22) o aumento foi observado também com a inoculação das mesmas bactérias, entretanto, os valores do peso seco foram menores, sendo de 16% para *P. mucidolens* e de 9% para *B. megaterium*. A diferença significativa do controle foi obtida só com *P. mucidolens*. Esses gêneros já foram relatados como endofíticos promotores de crescimento em plantas (Hallmann, et al., 1997, Gomes et al., 2003), entretanto, trabalhos com *Bacillus* endofítico relacionados à promoção de crescimento são poucos.

Os resultados demonstram que as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *M. saperdae*, *S. maltophilia*, *E. cloacae*, *B. megaterium* e *P. mucidolens* promoveram crescimento das plantas de milho. A maioria dessas bactérias aumentou a massa das raízes. Este fato indica que esse resultado pode ser devido à produção de auxina, pois uma das atuações do AIA é a diferenciação celular e o crescimento radicular. Observou-se que os altos valores não tiveram correlação com a promoção de crescimento.

Embora algumas bactérias endofíticas isoladas neste trabalho sejam capazes de sintetizar altas concentrações de AIA, a maioria não promoveu o crescimento das plantas de milho.

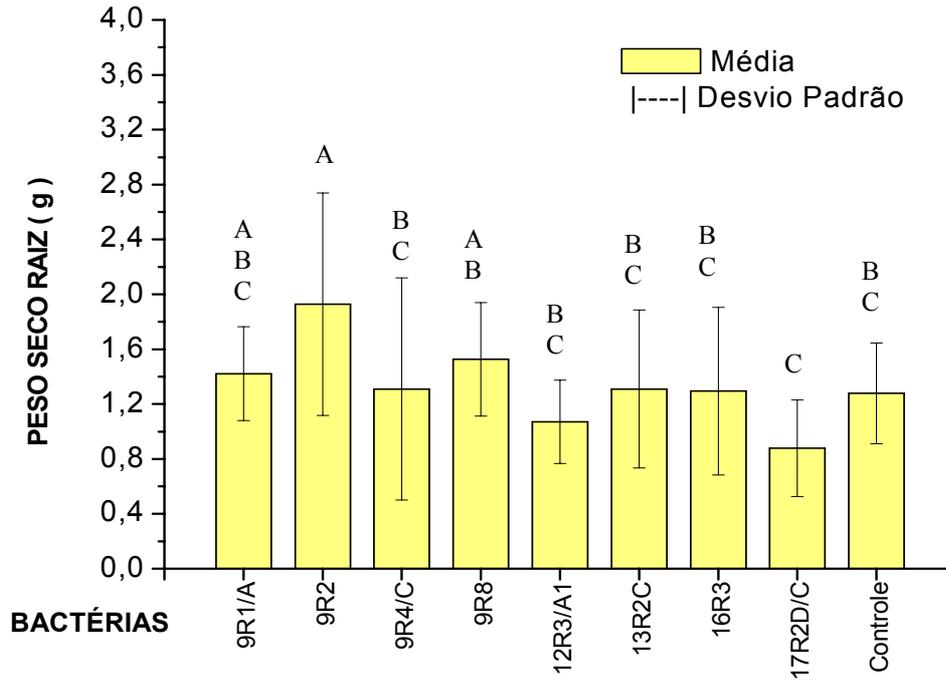


Figura 22 - Peso seco de raízes de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo com Zn + NPK (experimento V).

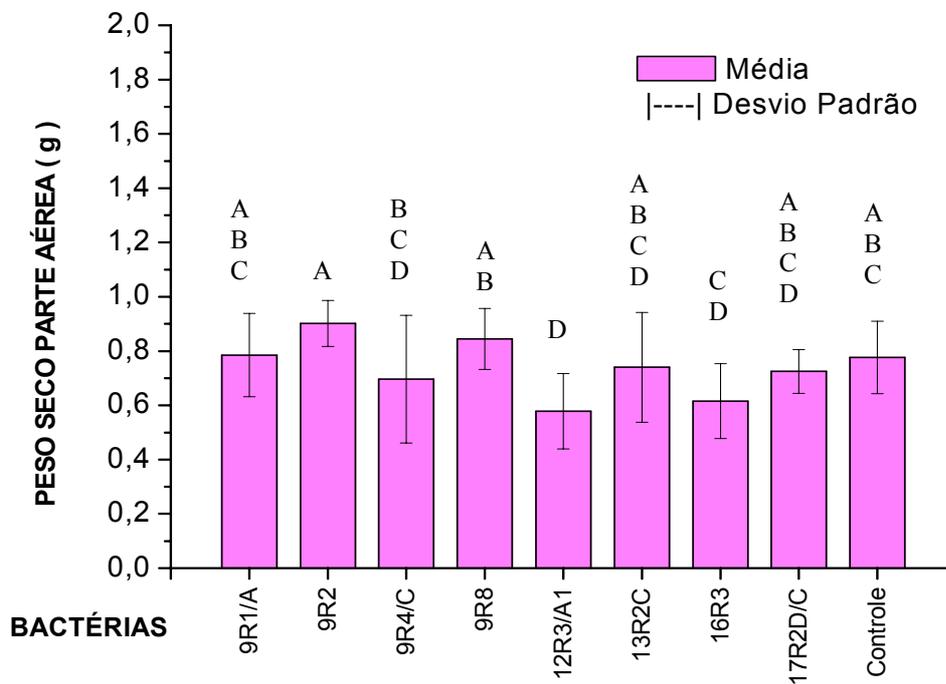


Figura 23 - Peso seco da parte aérea de plantas de milho inoculadas com bactérias endofíticas em solo com Zn + NPK (experimento V).

Os diversos fatores que influenciam a produção de AIA e a interação entre o AIA microbiano e o produzido pela planta podem ter influenciado negativamente no crescimento das plantas. A quantidade de AIA produzido por bactérias depende da espécie, da linhagem, do meio de cultura e das condições de cultivo (Tien *et al.*, 1979).

As condições na rizosfera oscilam com grande frequência, portanto, fatores como temperatura, pH, a disponibilidade de nutrientes e a concentração ótima de carbono influenciam a produção de auxina (Bastián, et al., 1998; Patten & Glick, 1996). Todos estes fatores também influenciam as bactérias endofíticas inoculadas em sementes, como verificado nos experimentos de promoção de crescimento realizados neste trabalho.

A interação entre o AIA microbiano e o produzido pela planta pode interferir no crescimento das mesmas. Patten e Glick (1996) sugerem que a entrada adicional de AIA microbiano pode modificar a auxina endógena para nível ótimo ou acima do ótimo, resultando na indução ou inibição de crescimento da planta. Portanto, o tamanho do inoculo bacteriano pode influenciar a promoção de crescimento (Harari *et al.*, 1989). Xie *et al.*, (1996), observaram que um mutante de *P. putida* GR12-2 (aux1), que produzia uma quantidade de AIA três vezes maior do que a linhagem selvagem inibiu a elongação das raízes de canola, enquanto a selvagem não inibiu. Esses autores sugerem que este efeito pode ser resultado do aumento do nível de AIA, que em altas

concentrações interage com a enzima ACC sintetase na planta, estimulando a síntese de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), o precursor imediato do hormônio etileno. Entretanto, tem sido observado que altas concentrações de etileno, após a germinação da semente, também inibem a elongação das raízes. Uma outra consideração é o nível de auxina sintetizada pela própria planta que nas raízes podem ser sub-ótimo ou ótimo ao crescimento (Pilet e Saugy, 1987).

A resposta da auxina pode também ser dependente do estágio de desenvolvimento da raiz da planta, o qual influi na composição e quantidade dos exsudatos (Pilet *et al.* 1979). Os exsudatos são essenciais à manutenção da sobrevivência das bactérias, bem como fonte de Trp e carbono para as mesmas.

Além dos fatores citados que influenciam a produção do AIA, existem vários fatores que influenciam a fixação de nitrogênio pelos endofíticos, como a concentração de oxigênio, concentração e tipo do recurso de carbono (C), a transferência do nitrogênio fixado para a planta e o conteúdo de nitrogênio (N) disponível (Gough, *et al.*, 1997). Esses fatores podem afetar a expressão dos genes *nif*, sendo assim, a bactéria pode possuir o gene, entretanto em condições desfavoráveis, não ocorrerá a expressão (Reiter *et al.*, 2003).

Thakuria *et al.* (2004) relataram que é difícil indicar os mecanismos necessários a maior habilidade da bactéria em promover o crescimento da planta. Discutem, porém, que um mecanismo de promoção de

crescimento pode ser aumentado, em condições de campo, na presença de uma comunidade microbiana complexa.

Na literatura existem vários trabalhos com a observação de que a presença de N_2 no solo inibe a fixação pelas bactérias (Laane et al., 1980; Cejudo e Paneque, 1986; Yoch e Whiting, 1986; Alexander e Zuberer, 1988), entretanto nos experimentos I e II nenhuma fonte de N_2 foi adicionada ao solo, e não houve um aumento na promoção de crescimento da planta com a inoculação das bactérias. Alexander e Zuberer (1988) realizaram experimentos durante 3 anos com a inoculação de bactérias diazotróficas entéricas e *Azospirillum* sp em milho e sorgo, para observação da influência de alguns fatores no crescimento e nas taxas de redução de acetileno (RA) dessas plantas. Estes autores observaram que as taxas de RA aumentaram dentro de 1-2 h após a adição de vários recursos de carbono. As fontes de carbono que mais estimularam a RA foram os ácidos orgânicos e os açúcares. Outro fator importante relacionado a RA que foi observado neste estudo foi a taxa de pressão de O_2 . Portanto, são necessários estudos neste sentido com as bactérias diazotróficas endofíticas isoladas neste trabalho.

No caso da fixação de nitrogênio as bactérias diazotróficas endofíticas têm vantagens, pois estão mais bem posicionadas para explorar os substratos de carbono da planta, além disso, colonizam nichos protegidos do oxigênio, condição necessária para a expressão da

atividade da nitrogenase e é sugerido que podem transferir muito mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos para a planta (Dobbelaere et al., 2003).

A falta de efeito significativo da maioria das bactérias endofíticas analisadas neste trabalho, com relação à promoção de crescimento, pode ter sido devido aos vários fatores apresentados.

Além dos fatores citados, o estudo com microrganismos endofíticos é relativamente recente, portanto não se tem conhecimento da relação dos mesmos com a planta, ficando evidente a necessidade de vários estudos para a utilização das bactérias endofíticas no aumento da produtividade agrícola e na redução dos impactos ambientais devido a utilização de fertilizantes, bem como outras finalidades.

Poucos estudos mostram o envolvimento de bactérias endofíticas com relação a características como produção de auxina, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato na promoção de crescimento de plantas, principalmente em milho.

A associação de microrganismos diazotróficos com a cana-de-açúcar foi avaliado e estimado como capaz de suprir até 60% das necessidades de nitrogênio desta cultura, mesmo em solos pobres (Boddey et al., 2003). No Brasil a produção de soja é um exemplo de eficiência da FBN, pois poucas aplicações de fertilizantes nitrogenados são realizadas. Uma estratégia similar para o milho pode ser possível.

As bactérias obtidas neste trabalho podem representar um componente importante no crescimento do milho em testes futuros nas condições em que as mesmas foram isoladas, ou em testes com variações em muitos fatores, os quais podem interferir na relação bactéria-planta, inclusive práticas de cultivo.

5 – CONCLUSÕES

1) Uma alta porcentagem das bactérias endofíticas têm a capacidade de produzir AIA, de solubilizar fosfato, de crescer em meio sem nitrogênio, e possuem o gene *nif H*, demonstrando o potencial para a aplicação biotecnológica.

2) O fato das bactérias isoladas neste estudo possuírem várias características citadas e a capacidade de se desenvolver como endofíticas, sugere simbiose dessas espécies com o milho

3) A grande maioria das bactérias com resultado positivo para as análises realizadas foi isolada de plantas provenientes de Lins, o que sugere que o uso ou não de agroquímicos, o genótipo e o estágio fenológico da planta, bem como o tipo de solo, podem de alguma forma, estar influenciando a população de endófitos.

4) Bactérias endofíticas pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae*, *M. saperdae*, *S. maltophilia*, *E. cloacae*, *B. megaterium* e *P. mucidolens* promoveram o aumento de peso de raiz e da parte aérea de plantas de milho, apresentando potencial para aplicação biotecnológica

6 – CONCLUSÕES GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a diversidade de bactérias endofíticas na cultura de milho, coletada de diferentes localidades do Estado de São Paulo, bem como o seu potencial para promoção de crescimento de plantas. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir:

1) Os gêneros das bactérias obtidas variaram de acordo com a região de coleta e, provavelmente, pelo genótipo e estágio fenológico da planta, bem como pela prática de cultivo.

2) O milho serve como habitat para uma microflora endofítica diversa. O grupo *Proteobacteria* prevaleceu nas comunidades bacterianas endofíticas e sua subdivisão gama e a Família *Enterobacteriaceae* foi a mais freqüente e com maior diversidade, sugerindo uma adaptação ao genótipos das plantas de milho amostradas.

3) As espécies *P. putida*, *B. cereus*, *B. lentimorbus*, *O. anthropi* e *S. maltophilia* foram isoladas em mais de um local, evidenciando a adaptação a diferentes cultivares e condições de cultivo.

4) Existe uma similaridade taxonômica entre algumas das espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus* e entre os isolados das espécies *Stenotrophomonas maltophilia* e *Ochrobactrum anthropi* isoladas das quatro localidades amostradas. Alguns isolados possuem

uma alta similaridade com isolados de plantas de locais diferentes e baixa similaridade com os isolados do mesmo local.

5) Uma alta porcentagem das bactérias endofíticas têm a capacidade de produzir AIA, de solubilizar fosfato, de crescer em meio sem nitrogênio, e possuem o gene *nif* H, demonstrando o potencial para a aplicação biotecnológica.

6) O fato das bactérias isoladas neste estudo possuírem várias características citadas e a capacidade de se desenvolver como endofíticas, sugere simbiose dessas espécies com o milho

7) A grande maioria das bactérias com resultado positivo para as análises realizadas foi isolada de plantas provenientes de Lins, o que sugere que o uso ou não de agroquímicos, o genótipo e o estágio fenológico da planta, bem como o tipo de solo, podem de alguma forma, estar influenciando a população de endófitos.

8) Bactérias endofíticas pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae*, *M. saperdae*, *S. maltophilia*, *E. cloacae*, *B. megaterium* e *P. mucidolens* promoveram o aumento de peso de raiz e da parte aérea de plantas de milho, apresentando potencial para aplicação biotecnológica

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOULAYE, S.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DELAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.214-222, 2001.

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, n.6, p.889-895, 2002.

ADAMS, P. D.; KLOEPPER, J. W. Effects of plant genotype on population of indigenous bacterial endophytes of nine cotton cultivars grown under field conditions. **Phytopathology**, v.88, p.52-61, 1998.

AGRIBUS - Anuário da agricultura brasileira São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativa, 2004. 200p.

ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. Impact of soil environmental factors on rates of N₂-fixation associated with roots of intact maize and sorghum plants. **Plant and Soil**, v.110, p.303-315, 1988.

ALVES, B.R.J.; DODDEY, R. M.; URGUAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v.252, p.1-9, 2003.

AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v.59, p.143-169, 1995.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., 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 JR, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; 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.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Microbial production of plant hormones. **Plant and Soil**, v.133, p.1-18, 1991.

AUMAN, A. J.; SPEAKE, C. C.; LIDSTROM, M. E. *nif* H Sequences and nitrogen fixation in Type I and Type II Methanotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4009-4016, 2001.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1998. p.117-137.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR, 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, 2000.

BAI, Y.; DÁOUST, F.; SMITH, D. L.; DRISCOLL, B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.230-238, 2002.

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, v.12, p.433-439, 1980.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, v.39, p.81-86, 1993.

BARENDSE, G. W. M.; PEETERS, T.J.M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v.44, p.3-17, 1995.

BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, v.67, p.2420-2429, 1989a.

BASHAN, Y.; REAM, Y.; LEVANONY, H.; SADE, A. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Botany**, v.67, p.1317-1324, 1989b.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant and Soil**, v.24, p.7-11, 1998.

BELL, C. R.; DECKIE, G. A.; HARVEY, W. L. G.; CHAN, J. M. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal Microbiology**, v. 41, p. 46-53, 1995.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. **Soil Biology Biochemistry**, v.30, p. 1484-1484, 1998.

BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v.27, p.225-237, 1998.

BILAL, R.; RASUL, G.; MAHMOOD, K.; MALIK, K. A. Nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of *Atriplex* spp. growing in saline sodic soils of Pakistan. **Biology and Fertility of Soils**, v.9, p.315-320, 1990.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsanto) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.45, p.147-156, 1993.

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

BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat. **Plant and Soil**, v.95, p.109-121, 1986.

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

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999.

BOTELHO, G.R.; GUIMARÃES, V.; DE BONIS, M.; FONSECA, M.E.F.; HAGLER, A. N.; HAGLER, L.C.M. Ecology of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens* colonizing the maize endorhizosphere in tropical soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, p.499-504, 1998.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.535-538, 1991.

BROWN, M.E. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. **Journal of Applied Bacteriology**, v.35, p. 443-445, 1972.

BROWN, M.E.; BURLINGHAM, S.K. Production of plant growth substances by *Azotobacter chroococum*. **Journal of General Microbiology**, v.53, p.135-144, 1968.

BULL, T.A.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.63, p.573-606, 2000.

BURR, T.J.; SCHROTH, M.N.; SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, v.68, p.1377-1383, 1978.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous endophyte in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p.3034-3043, 1978.

CEJUDO, F.J.; PANEQUE, A. Short-term nitrate (nitrite) inhibition of nitrogen fixation in *Azotobacter chroococum*. **Journal Bacteriology**, v.165, p.240-243, 1986.

CELLO, F.D.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology** v.63, p.4485-4493, 1997.

CHAN, Y.; BARRAQUIO, W. L.; KNOWLES, R. N₂-fixing pseudomonads and related soil bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, p.95-118, 1994.

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.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v.41, p.252-263, 2001.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.34, p.121-128, 2000.

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

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.

COOTHER, E. J.; DOWING, V. Bacteria associated with internal breakdown of onion and their possible role in disease expression. **Plant Disease**, v.35, p.329-336, 1986.

CORPE, W. A. A method for detecting methylotrophic bacteria on solid surfaces. **Journal of Microbiological Methods**, v.3, p.215-221, 1985.

COSTA, F. E. C. **Biodiversidade de bactérias endofíticas e rizosféricas de figo-da-índia (*Opuntia ficus-indica* Mill.) e potencial de aplicações biotecnológicas**. 2003. 87p. Dissertação (Mestrado) - USP/Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2003.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Molecular and General Genetics**, v.243, p.463-472, 1994.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J.M.; MONTEIRO, A.M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L. CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONO, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, v.38, p.273-284, 1999.

DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. **Nature**, v.237, p.102-103, 1972.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v.212, p.155-164, 1999.

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

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

DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODLEY, R.M. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. **Fertilizer Research**, v.42, p.339-346, 1995a.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPAB, 1995b. 60p.

DÖBEREINER, J.; GARCIA DE SALAMONE, I. Biological dinitrogen fixation in maize. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1992, Belo Horizonte. **Anais**. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 1995c. p.282-294.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; McCULLY, M.E. Further evidence that the N₂-Fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1843-1846, 1995.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.813-819, 1999.

EHMANN, A. The van urk-Salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **Journal of Chromatography**, v.132, p.267-276, 1977.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SUZUKI, H.; SATO, T.; SATO, Y.; MORISAKI, H.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K.. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.46, p.617-629, 2000.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in peacultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1036-1041, 2000.

ERNSTESSEN, A.; SANDBERG, G.; CROZIER, A.; WHEELER, C.T. Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. **Planta**, v.171, p.422-428, 1987.

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

FETT, W.F.; OSMAN, S.F.; DUNN, M. F. Auxin production by plant-pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1839-1845, 1987.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.) **New Phytologist**, v.122, p.299-305, 1992.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

FROMIN, N.; ACHOUAK, W.; THIERY, J.M.; HEULIN, T. The genotypic diversity of *Pseudomonas barssicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: influence of plant genotype. **FEMS Microbiology Ecology**, v.37, p.21-29, 2001.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**, v.154, p.145-150, 1993.

FULCHIERI, M.; LUCANGELI, C.; BOTTINI, R. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. **Plant Cell Physiology**, v.34, p.1305-1309, 1993.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1998. p.205-227.

GAGNÉ, S.; RICHARD, C.; ROUSSEAU, H.; ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfafa roots. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.996-1000, 1989.

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.

GLAWISCHNIG, E.; TOMAS, A.; EISENREICH, W.; SPITELLER, P.; BACHER, A.; GIERL, A. Auxin biosynthesis in maize kernels. **Plant Physiology**, v.123, p.1109-1119, 2000.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.109-117, 1995.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.793-796, 1995.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.4, p.701-705, 2003.

GOMES, J.; KARAZAWA, M. Como a planta de milho se desenvolve. In: IAPAR. **O milho no Paraná**. Londrina: IAPAR, 1984. p.33-49.

GOUGH, C.; VASSE, J.; GALERA, C.; WEBSTER, G.; COCKING, E.; DÉNARIÉ, J. Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots: *Arabidopsis thaliana* as a model plant. **Plant and Soil**, v.194, p.123-130, 1997.

GUTIÉRREZ-ZAMORA, M.L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.) **Journal of Biotechnology**, v. 91, p.117-126, 2001.

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.

HAAHTELA, K.; WATTIVAARA, T.; SUNDMANN, V.; SKUJINS, J. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, p.203-206, 1981.

HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. **Canadian Journal of Microbiology**, v.49, p.1-7, 2004.

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-KABANA, 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.

HARARI, A.; KIGE, J.; OKON, Y. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. **Plant and Soil**, v.110, p.275-282, 1988.

HARARI, A.; KIGEL, J.; OKON, Y. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. **Plant and Soil**, v.150, p.227-234, 1989.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.916-923, 1983.

HAUBEN, L.; VAUTERIN, L.; MOORE, E.R.B.; HOSTE, B.; SWINGS, J. Genomic diversity of genus *Stenotrophomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1749-1760, 1999.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. **Microbial Ecology**, v.35, p.1-21, 1998.

HINTON, D.M.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v.129, p.117-125, 1995.

HÖFLICH, G.; WIEHE, W.; KÜHN, G. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. **Experientia**, v.50, p.897-905, 1994.

HÜBNER, A. P. **Identificação de bactérias diazotróficas endofíticas do grupo *Bacillus* associado a raízes de plantas de arroz irrigado**. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.190-197, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.4765-4774, 1998.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, p.278-285, 1998.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN-MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, v.176, p. 1913-1923, 1994.

IKEDA, K.; TOYOTA, K.; KIMURA, M. Effects of soil compaction on the microbial populations of melon and maize rhizoplane. **Plant and Soil**, v.189, p. 91-96, 1997.

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D.A.. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.1262-1265, 1985.

JAIN, D.K.; PATROGUIN, D.G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.206-210, 1985.

KANESHIRO, T.; SLODKI, M.E.; PLATTNER, R.D. Tryptophan catabolism to indolepyruvic and indoleacetic acids by *Rhizobium japonicum* L-259 mutants. **Current Microbiology**, v.8, p.301-306, 1983.

KATSUJI, A.; NAKATANI, M.; MOCHIDA, H. Isolation of an endophytic diazotroph, *Klesiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.48, p.889-895, 2002.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: STATION DE PATHOLOGIE VÉGÉTALE ET PHYTOBACTÉRIOLOGIE (Ed.). **Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, I.N.R.** Angers: Gilbert-Clarey, 1978. v.2, p.879-882.

KLOEPPER, J.W. Effect of seed piece inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* on potato root and daughter tubers. **Phytopathology**, v.73, p.217-219, 1983.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr, 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.

LAANE, C.; KRONE, W.; KONINGS, W.N., HAAKER, H.; VEEGER, C. Short-term effect of ammonium chloride on nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* and by bacteroids of *Rhizobium leguminosarum*. **European Journal Biochemistry**, v.103, p.39-46, 1980.

LALANDE, R.; BISSONNETTE, N.; COUPLÉE, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potencial. **Plant and Soil**, v.115, p.7-11, 1989.

LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1112-1120, 1996.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LEE, S.; RETH, A.; MELETZUS, D.; SEVILHA, M.; KENNEDY, C. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.7088-7091, 2000.

LEUCHTMANN, A.; CLAY, K. Isozyme variation in the *Acremonium epichloe* fungal endophyte complex. **Phytopathology**, v.80, p.1133-1139, 1990.

LEVANOMY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B.; KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat root by immunogold labeling. **Plant and Soil**, v.117, p.207-218, 1989.

LIFSHITZ, R.; KLOEPPER, J.W.; KOZLOWSKI, M.; SIMONSON, C.; CARLSON, J.; TIPPING, E.M.; ZALESKA, I. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.390-395, 1987.

LÓPEZ-BUCIO, J.; HERNÁNDEZ-ABREU, E.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, L.; NIETO-JACOBO, M.F.; SIMPSON, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. **Plant Physiology**, v. 129, p. 244-256, 2002.

LUCON, C.M.M. **Caracterização de isolados de Fusarium moniliforme SHELD e efeito da bacterização de sementes de milho (Zea mays L.) no controle de patógeno**. 1998. 112f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista / UNESP, Rio Claro, 1998.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Eurípedes, 1980. 252p.

MANULIS, S.; VALINSKI, L.; GAFNI, Y.; HERSHENHORN, J. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in *Erwinia herbicola* in relation to pathogenicity on *Gypsophila paniculata*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.39, p.161-171, 1991.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDL, M.T.; LINFOW, S.E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, p.634-642, 1998.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole; resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.121-137, 2000.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. **Bulletin SROP**, v.14, p.328-331, 1991.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v.173, p.337-342, 1995.

MEHNAZ, S.; MIRZA, 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.

MELLO, M. R. F.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, M.; CAMARA, T. R.; ASSIS, S. M. P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.222-228, 2002.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1998. p.117-137.

MICHALCZUK, L.; RIBNICKY, D.M.; COOKE, T.J.; COHEN, J.D. Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. **Plant Physiology**, v.100, p.1346-1353, 1992.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-811, 1990.

MISHUSTIN, E.N.; NAUMOVA, A.N. Bacterial fertilizer, their effectiveness and mode of action. **Mikrobiologiya**, v.31, p.543-555, 1962.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v.42, p.399-407, 2002.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v.154, p.105-114, 2003.

MUKHOPADHAY, K.; GARRISON, N. K.; HINTON, D. M.; BACON, C. W.; KHUSH, G. S.; PECK, H. D.; DATTA, N. Identification and

characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathology**, v.134, p.151-159, 1996.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v.83, p.137-145, 2002.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.

NDOWORA, T.C.R.; KINKEL, L.L.; JONES, R.K.; ANDERSON, N.A. Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of streptomyces species isolated in Minnesota. **Phytopathology**, v.86, p.138-143, 1996.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna:Embrapa-CNPMA, 1998. p.15-60.

OKON, Y. Azospirillum as potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.223-338, 1985.

ÖSTIN, A.; ILI, N.; COHEN, J. D. An *in vitro* system from maize seedlings for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis. **Plant Physiology**, v.119, p.173-178, 1999.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.276, p.734-740, 1997.

PAL, K.K.; TILAK, K.V.; SAXENA, A. K.; DEY, R.; SINGH, C.S. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbial Research**, v.156, p.209-223, 2001.

PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P.W.; TRIPLETT, E.W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. **Plant and Soil**, v.186, p.135-142, 1996.

PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.900-915, 1983.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

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

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Spring Verlag, 1991. p.179-197.

PETRINI, O.; STONE, J. K.; CARROL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v.60, p.789-796, 1982.

PICARD, C.; DI CELLO, F.; VENTURA, M.; FANI, R.; GUCKERT, A. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphoroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.948-955, 2000.

PILET, P.E.; SAUGY, M. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA. **Plant Physiology**, v.83, p.33-38, 1987.

PILET, P.E.; ELLIOTT, M.C.; MOLONEY, M.M. Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. **Planta**, v.146, p.405-408, 1979.

PILLAY, V.K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.354-361, 1997.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p.665-672, 1995.

POSTGATE, J. **Fixação de nitrogênio**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1989. 84p.

PRIKRYL, Z.; VANCURA, V.; WURST, M. Auxin formation by rhizosphere bacteria as a factor of root growth. **Biologia Plantarum**, v.27, p.159-163, 1985.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; ONCKELEN, H. V. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.609-615, 1993.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1144-1154, 1996.

QUEIROZ, B.P.V. **Isolamento e seleção de rizobactérias para promoção de crescimento e controle de *Phytophthora parasítica* em citros**. 2003. 97f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2003.

QUISPEL, A.. Bacteria-plant interactions in symbiotic nitrogen fixation. **Physiologia Plantarum**, v.74, p.783-90, 1988.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. D. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* ssp. in natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.3, p.881-887, 1997.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

RAMOS, P.L. **Caracterização molecular de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas as gramíneas de importância econômica**. 2002. 56p. Dissertação (Mestrado) - Interunidades em Biotecnologia/USP, São Paulo, 2002.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v.151, p.167-177, 2000.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. (Ed.). **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.646-675.

REIS JÚNIOR, F.B.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L. D.; REIS, V.M.; MACHADO, A.T. **Seleção de genótipos de milho e arroz mais eficientes quanto ao ganho de N através de fixação biológica de N₂**.

Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1998. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 73).

REITER, B.; PFEIFER, V.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sbsp. *Atropptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268, 2002.

REITER, B.; BÜRGMANN, H.; BURG, K.; SESSITSCH, A. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, v.49, p.549-555, 2003.

RENNIE, R.J.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.462-467, 1982.

RITCHIE, N.J.; SCHUTTER, M.E.; DICK, R.P.; MYROLD, D.D. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1668-1675, 2000.

ROZSAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiology Review**, v. 51, p. 365-379, 1987.

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; SILVA, O. F.; BERIAM, L. O. S. Deterioração de polpa de frutas de melão causada por *Enterobacter cloacae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.281, 1995.

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

SALKOWSKI, I.N.; EHMANN, A. The van urk-salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives **Journal of Chromatography**, v.132, p.267-276, 1977.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNSKA, R.; BICK, M. Microflora within healthy tomatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.9, p.20-25, 1961.

SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **Tech Note** 101 MIDI. Newark, D.E., 1990.

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.

SELVADURAI, E.L.; BROWN A.E.; HAMILTON, J. T. G. Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.401-403, 1991.

SHAFFER, B. T.; WIDMER, F.; PORTEOUS, L. A.; SEIDLER, R. J. Temporal and spatial distribution of the nifH gene of N₂ fixing bacteria in forests and clearcuts in western Oregon. **Microbial Ecology**, v.39, p.12-21, 2000.

SHISHIDO, M.; BRENIL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.

SIEBER-CANAVESI, F.; PETRINI, O.; SIEBER, T. N. Endophytic leptostroma species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. **Mycologia**, v.83, p.89-96, 1991.

SIMONET, P.; GROSJEAN, M.C.; MISRA, A. K.; NAZARET, B. C.; NORMAND, P. Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.3278-3286, 1991.

SOBRAL, J. K.. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' / USP, Piracicaba, 2003.

SOUZA, A. O. **Isolamento e identificação de bactérias de milho (*Zea mayz* L.) e análise de sua variabilidade por RAPD**. 1996. 87f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' / USP, Piracicaba, 1996.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.

STREICHER, S.L.; GURNEY, E.G.; VALENTINE, R.C. The nitrogen fixation genes. **Nature**, v.239, p.495-499, 1972.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v.175, p.257-263, 1995.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.25, p.13-19, 1997.

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

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

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v.183, p. 214-220, 2001.

TAMAYO, G.; NADER, W.F.; SITTENFELD, A. Biodiversity for bioindustries. In: CALLOW, J.A.; FORD-LLOYD, B.V.; NEWBURY H.J. (Ed), **Biotechnology and plant genetic resources**, 1997, p. 255-279.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p.448-459, 2001.

TANG, Y.W.; BONNER, J.; EHMANN, A.. The van urk-salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **Journal of Chromatography**, v.132, p.267-276, 1977.

TANII, A.; BABA, T.; HARIKI, T. Bacteria isolated from black rot rice grains. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.40, p.309-318, 1974.

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

TEIXEIRA, M.A. **Diversidade de bactérias endofíticas de mandioca (*Manihotis esculenta* Crantz) coletad de diferentes regiões do Brasil**, 2004. 102f. Tese (Doutorado) - Interunidades em Biotecnologia/ICB/USP, São Paulo, 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.

THOMPSON, I.P.; BAILEY, M.J.; ELLIS, R.J.; PURDY, K.J. Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition. **FEMS Microbiology Ecology**, v.102, p.75-84, 1993.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBEL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.3, p.1016–1027, 1979.

TOMASINO, S.F.; LEISTER, R.T.; DIMOCK, R.M.; BEACH, R.M.; KELLY, J.L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis* expressing the insecticidal protein gene cryIA (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, v.3, p. 442-448, 1995.

TREVET, I. W.; HOLLIS, J. P. Bacteria in the storage organs of healthy plants. **Phytopathology**, v.38, p.960-967, 1948.

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.

VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, v.35, p.456-463, 1989.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A .K. Evaluation of plant growth

promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

VÖLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Microbial Ecology**, v.24, p.305-311, 1992.

XIE, H.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology**, v.32, p.67-71, 1996.

YOCH, D.C.; WHITING, G.J. Evidence for NH_4^+ switch-off regulation of nitrogenase activity by bacteria in salt marsh sediments and roots of the grass *Spartina alterniflora*. **Applied Environmental Microbiology**, v.51, p.143-149, 1986.

ZAPATA, F.; AMANN, H. ^{32}P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. **Fertilizer Research**, v.41, p.189-195, 1995.

ZEHR, J.P.; MELLON, M.T.; ZANI, S. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3444-3450, 1998.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S. M. STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, p.539-554, 2003.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z; KUCZMARSKI, 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.

APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA

Novo Fábio Pedrosa (nfb) (Dobereiner et al. 1955): ácido málico, 5.0 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; NaCl, 0.1 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02 g; solução de micronutrientes, 2 mL; azul de bromotimol (solução 0,5% em 0.2N KOH), 2 mL; FeEDTA (solução 1.64%), 4 mL; solução de vitaminas, 1 mL; KOH, 4.5g. Ajustar o pH para 6.5 ou 6.8 com NaOH e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Colocar as substâncias na ordem indicada. Para o meio Semi-Sólido, adicionam-se 1.75 a 1.8g de agar/L e para o meio sólido adicionam-se 15 g de agar/L. Esterilizar em autoclave a 120°C, por 20 minutos, sob 1 atm.

Tryptona Soya Ágar : 1,5 g.L⁻¹ de triptona; 0,5 g.L⁻¹ de peptona de soja; 1,5 g. L⁻¹ NaCl; 15 g.L⁻¹de agar

Amido Caseína: 10 g. L⁻¹; 2,0 g. L⁻¹ KNO_3 ; 0,3 g. L⁻¹ caseína; 2,0 g. L⁻¹ NaCl; 2,0 g. L⁻¹ K_2HPO_4 ; 0,05 g. L⁻¹ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g. L⁻¹ $CaCO_3$; 0,01 g. L⁻¹ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 16 g.L⁻¹.

SOLUÇÕES

Solução de micronutrientes do meio nfb: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.04 g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.2 g; H_3BO_3 , 1.40 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1.175 g. Completar o volume para 1 L com água destilada.

Solução de vitaminas do meio nfb: biotina, 10 mg; piridoxol-HCl, 20 mg. Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 mL com água destilada. Manter a solução em geladeira.

NaCl 1M: NaCl, 58.44 g. Dissolver para 1 L de água destilada. Esterilizar em autoclave a 120°C, por 15 minutos, sob 1 atm.

Reagente de Salkowski: FeCl₃.6H₂O, 2.03g; água destilada, 500 mL; HCl (densidade 1,840), 300 mL.

Reagente de Saponificação: NaOH (ACS), 45 g; metanol (HPLC), 150 mL; água deionizada, 150 mL.

Reagente de metilação: HCl 6.0N, 325 mL; metanol (HPLC), 275 mL.

Reagente de extração: hexano (HPLC), 200 mL; metil-terc-butil-éter (HPLC), 200mL.

Reagente de lavagem básica: NaOH (ACS), 10.8 g; água deionizada, 900 mL.

Solução de fenol saturado (Sambroock et al., 1989): Foram solubilizadas 500 g de fenol cristalizado em banho-maria a 65°C e adicionado um volume de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,0. Agitou-se a solução por 1 h. Retirou-se a fase aquosa e repetiu-se o procedimento com Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Em seguida, adicionou-se 1/10 do volume final de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e estocou-se em frasco escuro a 4°C.

Solução de EDTA 0,5 M (pH 7,5) (Sambroock et al., 1989): Na₂EDTA.2H₂O, 186.5 g; água destilada, 800 mL. O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH sólido. Após a solubilização completa do EDTA, o volume foi completado para 1 L com água destilada. A solução foi autoclavada por 20 minutos a 120°C e estocado em temperatura ambiente.

Solução Tris-HCl 1M (Sambroock et al., 1989): Tris base, 12.11 g; água Milli-Q, 80 mL. O pH foi ajustado para 7,5 com HCl concentrado, o volume completado para 100 mL com água Milli-Q, e autoclavado por 20 minutos a 120°C e estocado em temperatura ambiente.

Solução estoque de brometo de etídio 1 %: brometo de etídio, 100 mg; água destilada, 100 mL. O brometo de etídio foi dissolvido em água destilada durante 1 h com agitação, e depois estocado a 4°C, em frasco escuro.

Solução estoque de dNTP's: Os dNTP's (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) foram adquiridos (Life Technologies) numa concentração de 100 mM. Para uso foram misturados e diluídos em água Milli-Q, de modo a se obter uma concentração estoque de 2,5 mM de cada dNTP .

SOLUÇÕES TAMPÕES

Tampão TEB 5X (Tris -EDTA -Borato): Trizma base, 54 g; ácido bórico, 27.5 g; EDTA 0,5 M pH 8,0, 20 mL. Completar com água destilada para um volume de 1 L.

Tampão de amostra: glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25%. Dissolver em TE.