

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana
epifítica de soja (*Glycine max* L. Merrill)**

Mírian Lobo Sáber

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

Mírian Lobo Sáber
Licenciada em Ciências Biológicas

**Efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana
epifítica de soja (*Glycine max* L. Merrill)**

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Sáber, Mirian Lobo

Efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana epifítica de soja (*Glycine max* L. Merrill) / Mirian Lobo Sáber. - - Piracicaba, 2010.
73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Mudança climática 3. Radiação ultravioleta 4. Soja I. Título

CDD 633.34
S115e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

*Aos meus pais **Angela Maria Pereira Sáber** e **Francisco de Fátima Sáber**, pelo amor incondicional, apoio, compreensão, pela minha formação e por serem meus exemplos de vida.*

OFEREÇO

*Aos meus avôs **José Sáber** e **Sebastião Pereira**, pelos anos de muito amor e que com certeza estão orando por mim em algum lugar. Saudades!*

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento de qualquer trabalho sempre necessitará do auxílio de outras pessoas, seja direta ou indiretamente. E este auxílio é sempre essencial para o sucesso e para o crescimento de quem está sendo ajudado. Diante disso, utilizo deste pequeno espaço para agradecer de coração as pessoas que me ajudaram a realizar o presente trabalho:

- ✓ Ao **Prof. Dr. Itamar Soares de Melo**, pela orientação, apoio, ensinamentos e pelo privilégio de fazer parte da sua equipe de pesquisa;
- ✓ Ao **Prof. Dr. Fernando Dini Andreote**, pela ajuda, amizade, compreensão e principalmente por dividir comigo um pouco de seu conhecimento;
- ✓ Aos meus pais **Angela e Francisco**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e acreditando no meu potencial, minhas irmãs **Gisselly e Fernanda**, e meus amados sobrinhos **Isabella, Caíque, Caio, Mateus e Arthur**. Obrigada por fazerem parte da minha vida!
- ✓ Às grandes amigas: **Vanessa Nessner Kavamura, Suikinai Nobre Santos, Maria Augusta Machado (Guta), Regiane Iost (Figura) e Jussara Ferreira Alves**. Obrigada pelos conhecimentos adquiridos, paciência nos momentos difíceis e principalmente pelas risadas nestes excelentes dois anos de convívio.
- ✓ Aos **queridos amigos que estão ou que já passaram pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente (LMA)**: Wallace Rafael de Souza, Natalia Carvalhaes, Cassiano Forner, Alexandre Visconti, Leonardo José da Silva, Michelli de Souza dos Santos, Lívia Mendes, Luciana Ávila, Angela Valente, Breno Betim, Giulia Almeida, Jonathan Giovedy, Zayame Pinto, Carla Almeida, Osvaldo Ferreira Junior e Alexandre Sereda.

- ✓ Aos **técnicos do LMA**: João Luiz da Silva, Roseli S. Nascimento, Márcia Maria Parma, Elke S. D. Vilela, pela ajuda durante todo o trabalho e pelas análises realizadas.
- ✓ Em especial aos meus amados amigos **Laureane da Cruz Ferreira e Armando Cavalcante Franco Dias** pelo incentivo para entrar na área da pesquisa, confiança e sincera amizade.
- ✓ À **EMBRAPA Meio Ambiente** pelo suporte para a realização do meu trabalho.
- ✓ Às pesquisadoras **Rosa Frighetto e Eunice Reis** pela ajuda e apoio no projeto.
- ✓ A todos os **colegas do PPG Microbiologia Agrícola** da ESALQ-USP e à **Giovana**, secretária do programa de pós-graduação, por toda a ajuda.
- ✓ À professora **Siu Mui Tsai, Ademir Durrer, Rodrigo Taketani e Tomio** pela ajuda com as análises de DGGE.
- ✓ À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelos fitopatógenos cedidos.
- ✓ À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro.
- ✓ A **todos** aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada!

"O conhecimento amplia a vida. Conhecer é viver uma realidade que a ignorância impede desfrutar".

(Carlos Bernardo González Pecotche)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 DESENVOLVIMENTO	21
2.1 Revisão bibliográfica	21
2.1.1 A cultura da soja (<i>Glycine max</i> L. Merrill).....	21
2.1.2 Importância.....	23
2.1.3 Interação planta-micro-organismo	24
2.1.4 Filosfera.....	25
2.1.5 Controle biológico.....	27
2.1.6 Mudanças climáticas	28
2.1.6.1 Radiação ultravioleta	28
2.1.6.1.1 Efeitos da radiação ultravioleta B em micro-organismos e mecanismos de proteção	29
2.1.7 Microbiologia molecular no estudo de comunidades bacterianas	31
2.1.8 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE – <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>).....	31
2.1.9 Análise multivariada aplicada aos perfis de PCR-DGGE	32
2.2 Material e Métodos.....	33
2.2.1 Isolamento de Bactérias Epifíticas da soja (cultivar “Conquista”).....	34
2.2.2 Avaliação da atividade de antagonismo	35
2.2.3 Delineamento experimental.....	37
2.2.4 Isolamento de bactérias epifíticas de soja (cultivares IAC 100 e BRS 262)	39
2.2.5 Identificação de bactérias epifíticas de soja por análise de ácidos graxos.....	40
2.2.6 Extração de DNA genômico bacteriano	40
2.2.7 Amplificação do gene 16S DNAr.....	41
2.2.8 Purificação do produto de PCR.....	42
2.2.9 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	42

2.2.10 Teste de resistência de bactérias epifíticas à radiação UV-B	42
2.2.11 Análise por meio da técnica de PCR-DGGE.....	44
2.2.12 Análise estatística	45
2.3 Resultados.....	45
2.3.1 Isolamento de bactérias epifíticas de soja	45
2.3.2 Ensaio de antagonismo	46
2.3.3 Isolamento de bactérias epifíticas da folha de soja (IAC 100 e BRS 262) dos experimentos de campo.....	48
2.3.4 Identificação de bactérias epifíticas de soja por análise de ácidos graxos (FAME) e o gene 16s rDNA.	52
2.3.5 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)	53
2.3.6 Avaliação <i>in vitro</i> da resistência de bactérias epifíticas à radiação UV-B.....	54
2.3.7 Análise de DGGE da comunidade bacteriana epifítica de soja.....	56
2.4 Discussão	59
3 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	67

RESUMO

Efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana epifítica de soja (*Glycine max* L. Merrill)

A interação entre bactérias e plantas resulta na ocorrência de vários processos biológicos no ambiente e pode ser regulada por diferentes variáveis. Alterações nos fatores bióticos e abióticos interferem diretamente nesta interação levando a modificações na composição das comunidades bacterianas associadas às plantas. Dentre estas, as bactérias epifíticas podem conferir ao seu hospedeiro características como maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas e proteção contra fitopatógenos. Com os objetivos de avaliar o efeito da radiação ultravioleta B sobre a diversidade bacteriana epifítica de dois cultivares de soja, avaliar a resistência dos isolados sobre a radiação e verificar o potencial antagônico dos residentes bacterianos da filosfera da soja. Para tanto, foram feitos dois isolamentos com finalidades distintas dos cultivares “Conquista”, IAC 100 e BRS 262, além da aplicação da técnica de DGGE, que permite acessar alterações causadas nestas comunidades de maneira independente do cultivo bacteriano. Foi avaliado também o efeito da radiação UV-B na composição e dinâmica da comunidade bacteriana dos cultivares de soja, IAC 100 e BRS 262, cultivadas sob tratamento com UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído. Além do potencial antagônico frente à fitopatógenos importantes como *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*, as bactérias epifíticas de soja demonstraram que, em geral, são tolerantes a exposição à radiação ultravioleta B, com destaque para bactérias pigmentadas e as que possuem outros métodos de proteção, como por exemplo, a produção de exopolissacarídeos. Outro fator analisado no presente estudo foi a diferença significativa da densidade populacional de bactérias epifíticas cultiváveis de acordo com os estádios fenológicos da soja, onde a fase R1 foi a que apresentou um maior número de bactérias cultiváveis. De maneira geral, as análises de DGGE demonstrou que houve diferença significativa da comunidade bacteriana epifítica dos cultivares de soja de acordo com o estágio fenológico da planta, quando comparada ao acréscimo de radiação recebida. Os resultados obtidos podem oferecer uma contribuição para melhor compreensão na interação entre micro-organismos e a soja, auxiliando na predição de resposta das comunidades epifíticas de acordo com o aumento da incidência da radiação ultravioleta B e estádios fenológicos da planta, levando conseqüentemente, ao entendimento de como deve se comportar tal interação no contexto das mudanças climáticas.

Palavras-chave: Bactérias; Mudança climática; Radiação ultravioleta; Soja

ABSTRACT

Effect of ultraviolet B radiation on epiphytic bacterial community of soybean (*Glycine max* L. Merrill)

The interaction between bacteria and plants results in the occurrence of many biological processes in the environment and can be regulated by different variables. Changes in biotic and abiotic factors directly interfere with this interaction leading to changes in the composition of bacterial communities associated with plants. Among those, the epiphytic bacteria can confer some characteristics to their host such as increased resistance to stress conditions, changes in physiological conditions and protection against pathogens. The goals of this work were to evaluate the effect of ultraviolet B radiation on the diversity of epiphytic bacterial of two soybean cultivars, evaluate the resistance of the isolates under radiation and investigate the antagonistic potential of soybean native phyllosphere microorganisms. For this purpose, two isolations of the cultivars "Conquest", IAC 100 and BRS 262 were made for different purposes. DGGE which allows the detection of changes in the communities in a culture independent approach was also performed. We evaluated the effect of UV-B in the composition and dynamics of bacterial community of soybean cultivars, IAC 100 and BRS 262, grown under solar UV treatments, increased UV-B and decreased UV-B. The antagonism against important phytopathogens such as *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* was also tested, showing that soybean epiphytic bacteria, in general, are tolerant to exposure to ultraviolet B radiation, especially pigmented bacteria and those with other methods of protection, such as the production of exopolysaccharides. Another factor examined in this study was the significant difference in population densities of epiphytic culturable bacteria according to the soybean stages, where the R1 stage showed a greater number of culturable bacteria. In general, the DGGE analysis showed that there were significant differences in the epiphytic bacterial community of soybean cultivars according to the developmental stage of the plant, as compared to the increase of incoming radiation. The results may offer a contribution to better understanding the interaction between microorganisms and soybeans, helping to predict the response of epiphytic communities in accordance with the increased incidence of ultraviolet B radiation and plant growth stages, thus leading to the understanding of the behavior of such an interaction in the context of climate changes.

Keywords: Bacteria; Climate change, Ultraviolet radiation; Soybean

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho 35
- Figura 2 - Experimento de campo realizado na Embrapa Meio-Ambiente, (A) parcela com UV solar, (B) parcela com UV-B aumentado e (C) parcela sem UV-B39
- Figura 3 - Irradiância espectral da lâmpada (EL UVB-313, Q-Lab, EUA) utilizada para o teste de resistência à UV-B, medida através do espectrômetro USB2000+RAD, Ocean Optics, EUA 44
- Figura 4 - Pareamento de cultura dos isolados epifíticos de soja frente à fitopatógenos. (A) Halo de inibição contra *R. solani* formado pelos isolados EPa 36 e EP 151; (B) halo de inibição contra *R. solani* formado pelo isolado EPa 11; (C) halo de inibição formado contra *P. aphanidermatum* pelo isolado EPj 30 e (D) Ação fungistática contra *F. solani* pelos isolados EPj 30 e EPa 41 49
- Figura 5 - Densidade populacional total da comunidade bacteriana epifítica de soja durante as fases V3; V6 e R1, nas cultivares IAC 100 e BRS 262. Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P > 0.01$) 50
- Figura 6 - Densidade populacional total da comunidade bacteriana epifítica das cultivares IAC 100 (a) e BRS 262 (B) de soja, durante as fases: V3; V6 e R1 sob radiação UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído. Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P > 0.01$) 51
- Figura 7 - Densidade populacional total da comunidade bacteriana epifítica pigmentada e não pigmentada dos cultivares IAC 100 (A) e BRS 262 (B) de soja, sob radiação UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído. Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P > 0.01$). 52

Figura 8 - Sobrevivência de isolados não pigmentados da filosfera de soja após irradiação com UV-B, onde EP 209 (▲) e EP 188 (△) são bons produtores de EPS. Cada ponto representado significa as triplicatas do experimento 56

Figura 9 - Sobrevivência de isolados pigmentados da filosfera de soja após irradiação com UV-B, onde EP 10 (●) e EP 96 (□) produzem pigmentos amarelos, EP 139 (■) produz pigmento rosa e EP 242 (×) produz pigmento laranja. Cada ponto representado significa as triplicatas do experimento..... 57

Figura 10 - Análise de redundância (RDA) entre o perfil de bandas de DGGE, obtidos das amostras de folhas de soja dos cultivares IAC 100 (A, B e C) e BRS 262 (D, E e F), com oligonucleotídeos universais para Bacteria (A e D); específicos para β -Proteobacteria (B e E) e para o gênero *Pseudomonas* (C e F). O fator ambiental marcado com * foi significativo para determinar a composição das comunidades bacterianas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de permutação de Monte Carlo..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição sumária dos estádios fenológicos vegetativos (V) e reprodutivos (R) de soja.....	23
Tabela 2 - Fungos fitopatogênicos utilizados no experimento de antagonismo.....	37
Tabela 3 - Tipos de interação entre os isolados bacterianos epifíticos da folha de soja e fungos fitopatogênicos.....	47
Tabela 4 - Título da tabela	53
Tabela 5- Avaliação* da produção de EPS por bactérias epifíticas de soja em diferentes fontes de carbono.....	55
Tabela 6 - Variância explicada por cada uma das variáveis ambientais nas comunidades bacterianas da filosfera dos cultivares IAC 100 e BRS 262 de soja. A composição das comunidades foi avaliada por meio de perfis de bandas de DGGE obtidos com amplificação com oligonucleotídeos para o domínio Bacteria, para o grupo β -Proteobacteria e o gênero <i>Pseudomonas</i>	58

1 INTRODUÇÃO

As plantas podem ser consideradas um micro ecossistema complexo onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de bactérias. Neste aspecto, bactérias são habitantes comuns da superfície e do interior da maioria dos vegetais, podendo apresentar relações neutras e simbióticas com a planta hospedeira. As bactérias associadas às plantas são chamadas de epifíticas quando crescem e vivem sobre a superfície vegetal.

A superfície das folhas das plantas, denominada filosfera, representa um nicho com grande significância agrícola e ambiental, visto que é considerado um ambiente hostil, exposto à rápida variação na temperatura e umidade relativa, nutrientes limitados e exposição à radiação ultravioleta.

Uma variedade de fatores que envolvem a planta, micro-organismos e meio ambiente controlam o estabelecimento da comunidade microbiana da filosfera, mas recentemente houve um reconhecimento de que o genótipo da planta desempenha um papel na seleção das comunidades da filosfera.

Os mecanismos envolvidos na interação bactérias-planta podem envolver diversos fatores bióticos e abióticos. Estes mecanismos necessitam de mais estudos para um melhor entendimento e posterior utilização de suas propriedades. Desta forma, estudos de ecologia microbiana que buscam aumentar e consolidar os conhecimentos a respeito dos processos interativos no ambiente podem auxiliar o entendimento deste processo, já que foi observado que estas bactérias podem conferir ao seu hospedeiro maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas e proteção contra organismos patogênicos.

Atualmente, a capacidade de bactérias associadas ao desenvolvimento e saúde da planta, seja por antagonismo a patógenos ou por proteção contra estresses, têm recebido especial atenção. Sabe-se que diversos fatores ambientais podem atuar sobre esta comunidade benéfica para a planta hospedeira, sendo, portanto, de grande importância o conhecimento destes fatores e suas implicações para a agricultura.

Um dos importantes fatores ambientais que podem atuar sobre a comunidade microbiana da filosfera é a radiação ultravioleta B (UV-B), que age diretamente no DNA,

incitando a formação de lesões que resultam no bloqueio da replicação e transcrição podendo ser letal.

As comunidades bacterianas em interação com as plantas respondem rapidamente a alterações do ambiente. Desta forma, podem ser usadas como indicadores de alterações ambientais, sendo estas comunidades as primeiras a serem afetadas. Assim, o possível desequilíbrio que o aumento da incidência de radiação pode acarretar refletirá na saúde e produtividade das plantas.

Em contraponto, os micro-organismos possuem mecanismos de reparo e de proteção para melhor sobrevivência, que incluem reparo de dano no DNA, produção de pigmentação e exopolissacarídeos (EPS) ou menor crescimento na copa das plantas e a colonização em sítios protegidos de UV, como locais sombreados. A produção de EPS pode proteger as bactérias do estresse hídrico, grandes incidências de radiação e ajudar a ancorar as células na superfície foliar e, juntamente com a pigmentação, absorvem a radiação ultravioleta. Contudo, a alteração que a radiação ultravioleta B ocasiona na filosfera é diferenciada de planta para planta ou mesmo em partes diferentes da mesma planta. Portanto, para estudar a alteração da UV-B na filosfera da soja, há a necessidade do estudo não somente com métodos dependentes de cultivo, mas também com metodologias que analisam tais comunidades como um todo, onde se pode acessar a comunidade microbiana total deste habitat.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da radiação ultravioleta B sobre a comunidade bacteriana epifítica de dois cultivares de soja, por meio de técnica independente de cultivo, avaliar os efeitos dos tratamentos sobre os micro-organismos cultiváveis, bem como a resistência dos isolados sobre a radiação, além do potencial antagônico dos residentes bacterianos da filosfera da soja.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A cultura da soja (*Glycine max* L. Merril)

A soja cultivada comercialmente hoje (*Glycine max* (L) Merril), é uma planta herbácea, incluída na classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leguminosae, subfamília das Papilionoideae, gênero *Glycine* L., que varia de 60 cm a 1,5 m de altura, anual, ereta, pubescente, de pelos brancos, pardo-queimada e tostados. O seu sistema radicular consta de uma raiz principal pivotante, com ramificações ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. As folhas são alternadas, de pecíolos longos e compostas de três folíolos grandes, geralmente ovais. As flores são axilares ou terminais, do tipo papilionada, brancas, amarelas ou violáceas, segundo a variedade. Os frutos, do tipo vagem, são achatados, curtos, de cor cinzenta, amarelo-palha ou preta, e encerram de duas a cinco sementes (BORÉM, 2005). Estas são, geralmente, elípticas e achatadas, de cor amarela, verde ou preta nas variedades cultivadas (MISSÃO, 2006). Os estádios fenológicos vegetativos estão citados na Tabela 1.

Originária da região da China Antiga, constituindo-se na base alimentar do povo chinês há mais de cinco mil anos (EMBRAPA, 2008), espalhou-se pelo mundo através dos viajantes ingleses e imigrantes japoneses e chineses. Chegou ao Brasil no início do século XX, mas devido à grande quebra da safra da Rússia e a incapacidade dos Estados Unidos suprirem a demanda mundial em meados dos anos 70, o Brasil superou a China que era a Segunda maior produtora do mundo (MISSÃO, 2006).

Tabela1- Descrição sumária dos estádios fenológicos vegetativos (V) e reprodutivos (R) de soja (NEUMAIER et al., 2000)

(continuação)

Estádio		Descrição
Símbolo	Denominação	
VÊ	Emergência	Cotilédones acima da superfície do solo
VC	Cotilédone	Cotilédones completamente abertos
V1	Primeiro nó	Folhas unifolioladas completamente desenvolvidas
V2	Segundo nó	Primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida
V3	Terceiro nó	Segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida
V4	Quarto nó	Terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida
V5	Quinto nó	Quarta folha trifoliolada completamente desenvolvida
V6	Sexto nó	Quinta folha trifoliolada completamente desenvolvida
Vn	Enésimo nó	Anti-enésima folha trifoliolada completamente desenvolvida
R1	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó da haste principal
R2	Florescimento pleno	Uma flor aberta em um dos 2 últimos nós da haste principal com folha completamente desenvolvida
R3	Início da formação da vagem	Vagem com 5 mm de comprimento em um dos 4 últimos nós da haste principal, com folha completamente desenvolvida
R4	Vagem completamente desenvolvida	Vagem com 2 cm de comprimento em um dos 4 últimos nós da haste principal, com folha completamente desenvolvida
R5	Início do enchimento do grão	Grão com 3 mm de comprimento em uma vagem em um dos 4 últimos nós da haste principal, com folha completamente desenvolvida

Tabela1 - Descrição sumária dos estádios fenológicos vegetativos (V) e reprodutivos (R) de soja (NEUMAIER et al., 2000)

(conclusão)

Estádio		Descrição
Símbolo	Denominação	
R6	Grão verde ou vagem cheia	Uma vagem contendo grãos verdes preenchendo as cavidades da vagem de um dos 4 últimos nós da haste principal com folha completamente desenvolvida
R7	Início da maturação	Uma vagem normal na haste principal com coloração de madura
R8	Maturação plena	95% das vagens com coloração de madura

2.1.2 Importância

No âmbito do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento entre os mais expressivos. Isto pode ser atribuído a diversos fatores, tais como: estruturação de um grande mercado internacional relacionado com o comércio de produtos do complexo soja; consolidação da oleaginosa como importante fonte de proteína vegetal, que viabilizaram a expansão da exploração sojícola para diversas regiões do mundo (DALL'AGNOL; LAZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

A soja é a segunda principal oleaginosa cultivada no mundo, depois do dendê, com grande importância econômica a nível mundial (DALL'AGNOL; LAZAROTTO; HIRAKURI, 2010). A importância desta cultura se deve às suas inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia, como por exemplo, a fabricação de proteína texturizada de soja, leite de soja, entre outros.

O óleo e o farelo resultante do processamento da soja atendem a demanda do mercado interno e externo. O óleo é empregado em margarinas, gorduras, óleos para cozinha e salada, e o farelo é empregado na fabricação de tofu, molho de soja,

produtos que simulam leite e carne, além da utilização na fabricação de rações para a alimentação principalmente de suínos e aves, devido seu alto teor de proteína (EMBRAPA, 2008).

A produção da soja brasileira é o melhor exemplo do aumento mundial na procura por grãos, tanto como fonte de nutrientes para alimentação quanto para aplicação na geração de energia (MISSÃO, 2006).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja, que ocupa apenas cerca de 2,7% da área total do País. A soja, além de ser utilizada como alimento, para atender o mercado interno e externo, é a principal fonte de óleo para a crescente produção nacional de biodiesel. A evolução mundial do mercado dos biocombustíveis é uma importante alternativa para a diminuição da emissão do CO₂, um dos gases causadores do aquecimento global (DALL'AGNOL; LAZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

O Brasil é o país que possui o maior potencial de expansão da área cultivada, podendo duplicar sua atual produção dependendo da necessidade de consumo do mercado de farelo e de óleo, sendo considerado o segundo maior produtor do mundo; porém claras indicações evidenciam que ainda no decorrer dessa década será o primeiro devido às limitações de área para expansão nos demais países produtores (EMBRAPA, 2008).

As principais regiões produtoras de soja do Brasil são Centro Oeste, Norte e Nordeste, acrescentando o estado de Minas Gerais. Esse avanço da soja pelo bioma do Cerrado foi mais espetacular no Estado do Mato Grosso, consolidando-o como líder incontestável na produção da oleaginosa (DALL'AGNOL; LAZAROTTO; HIRAKURI, 2010).

2.1.3 Interação planta-micro-organismo

Há uma imensa diversidade de micro-organismos que interagem com tecidos e células das plantas, podendo ser patogênicas ou benéficas (WELLER, 1988; SMITH, 1992). O conhecimento sobre a interação bactéria-planta é indispensável para que se possa manter, manipular e modificar populações benéficas para a produção agrícola.

As bactérias não ocorrem em um padrão uniforme em toda superfície foliar, mas estão localizados em sítios específicos (BEATTIE; LINDOW, 1999). Em estudos utilizando microscopia eletrônica de varredura demonstraram que as localizações mais comuns de colonização bacteriana estão na base dos tricomas glandulares (ANDREWS; HARRIS, 2000) e nos estômatos (MARIANO; McCARTNER, 1993).

Beattie e Lindow (1995) descreveram duas estratégias que as bactérias podem utilizar para sobreviver às grandes e rápidas variações de condições que ocorrem na superfície foliar. A estratégia de tolerância exige a capacidade de tolerar a exposição direta à radiação ultravioleta, baixa disponibilidade hídrica e outras tensões nas superfícies foliares. Em contraste, a estratégia de prevenção exige a capacidade para procurar e explorar os sítios que são protegidos contra esses estresses, incluindo sítios nas regiões internas das folhas.

2.1.4 Filosfera

A superfície das folhas das plantas, denominada filofera, é um habitat extenso e extremamente diverso para os micro-organismos, caracterizada por mudanças rápidas na temperatura, suprimento de água e nutrientes, radiação ultravioleta (UV) e pressão osmótica (BEATTIE; LINDOW, 1999). A filofera tem muitas características que a tornam um excelente habitat para estudar a ecologia microbiana. As folhas são límpidas, micro-organismos podem ser observados diretamente nas folhas permitindo a utilização de novas técnicas poderosas de microscopia para mensurar a identidade, atividade e expressão gênica microbiana (LINDOW; BRANDL, 2003).

Espécies microbianas em superfícies foliares são denominadas epifíticas, pois são aquelas que crescem, multiplicam-se e se estabelecem sobre a superfície vegetal (BEATTIE; LINDOW, 1999), e incluem membros dos grupos fúngico e bacteriano.

A população da filofera compete por recursos limitados, está exposta a níveis elevados de radiação ultravioleta e altos níveis de radiação visível. Esse habitat pode variar a extremos de temperatura e exposição ultravioleta em prazos muito curtos (BAILEY et al., 2006). Múltiplos fatores químicos, físicos e oscilações nas condições

nutricionais da filosfera limitam o crescimento, a sobrevivência e diferem acentuadamente o tamanho da população bacteriana em plantas da mesma espécie. Assim, pode-se crer na existência de mecanismos seletivos para fenótipos específicos que permitam às bactérias epifíticas a capacidade de modificar seus micro habitats, a fim de aumentar a disponibilidade de nutrientes do filoplano. Esses fenótipos podem incluir características que conferem à bactéria a capacidade de modificar seus micro habitats, a fim de aumentar a disponibilidade de nutrientes no filoplano (LINDOW; BRANDL, 2003).

Bactérias do gênero *Pantoea* e da espécie *Pseudomonas syringae* são os micro-organismos epifíticos colonizadores mais abundantes. A principal causa da abundância desses micro-organismos é a disponibilidade de fontes de carbono (ANDREWS; HARRIS, 2000) que são: glicose, frutose e sacarose (REIS, 2005). Na superfície foliar existem áreas desertas e áreas com população elevada, geralmente formando micro colônias ou biofilmes. Estas micro colônias são locais ideais para a comunicação bacteriana (LUTEMBERG et al., 2001).

Na epiderme das folhas se encontram os estômatos, que permitem a troca gasosa e a perda de água. Quando estão abertos servem como principal via de colonização interna, pois permitem a entrada aos espaços intracelulares (BEATTIE; LINDOW, 1995, 1999). Além disso, as diferentes espécies de plantas parecem influenciar a quantidade de bactérias cultiváveis, como as bactérias isoladas de folhas de pepino e feijão, que foram significativamente maiores do que as isoladas das folhas de gramíneas (KINKEL et al., 2000).

Ercolani (1991) encontrou diferentes padrões de colonização e diversidade da comunidade bacteriana nas épocas do ano, sendo reduzidos durante os meses quentes e secos e elevados nos meses frios e chuvosos. Estudos sobre a comunidade bacteriana em folhas são numerosas, mas de alcance limitado. Acreditava-se que as populações bacterianas aeróbicas cultiváveis eram dominadas por poucos gêneros, porém os exaustivos estudos da comunidade microbiana em folhas têm proporcionado importantes conhecimentos sobre a identidade e a ecologia dos habitantes bacterianos de folhas (DICKINSON et al., 1975; ERCOLANI, 1978, 1991; JACQUES et al., 1995).

Um dos fatores que interfere na produtividade da soja é a sua associação com vários patógenos, em diferentes estádios de desenvolvimento. Mais de 100 patógenos afetam a soja, onde aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus já foram constatadas no Brasil, porém a importância econômica pode variar de ano pra ano dependendo das condições climáticas (GHINI; HAMADA, 2008).

2.1.5 Controle biológico

O controle biológico de pragas e doenças consiste no uso de micro-organismos que atuam como antagonistas aos agentes causadores de prejuízos de plantas (AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI, 2000). Os mecanismos de controle biológico podem ser por competição por um nicho ecológico ou por substrato, pela produção de moléculas inibitórias, por indução de resistência sistêmica no hospedeiro contra patógenos ou contra estresses abióticos (GLICK, 1995).

A utilização do controle biológico em doença da parte aérea de plantas é comumente empregada através da introdução de antagonistas no filoplano (BETTIOL, 1991). Todavia, o sucesso dessa prática encontra-se calcado na capacidade do antagonista se multiplicar e colonizar o filoplano (BLAKEMAN; FOKKEMA, 1982). Segundo Bettiol (1991), as chances de êxito, nessas condições, são aumentadas quando se utiliza antagonistas originários do filoplano em que serão inoculados, pois possuem mecanismos de sobrevivência já adaptados, diminuindo a necessidade de serem reaplicados com maior frequência.

Como a planta, os patógenos e a comunidade microbiana associada à filosfera são influenciados pelo ambiente. O controle biológico da filosfera é influenciado tanto pelo clima quanto pelo microclima da superfície da planta, que estão em constantes alterações. Dessa forma, as mudanças climáticas influenciarão mais acentuadamente o controle biológico na parte aérea do que do solo, pois os organismos nesse ambiente são mais expostos às alterações de umidade e temperatura e às radiações (BETTIOL, 2009).

2.1.6 Mudanças climáticas

As evidências de que ocorrerão mudanças climáticas globais (MCG) em função do aumento da concentração de gases de efeito estufa como o gás carbônico (CO₂), o metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O), além do próprio vapor d'água (H₂O), têm se apresentado cada vez mais consistentemente e sido aceitas pela comunidade científica internacional (PELLEGRINO; ASSAD; MARIN, 2007).

Embora aparentemente distantes, as mudanças climáticas também ocorrerão no Brasil e, talvez, com efeitos mais danosos pela vulnerabilidade histórica que o país apresenta a desastres naturais, como secas, enchentes e deslizamentos de encostas. Há também a previsão de maior frequência de fenômenos extremos que podem ser especialmente danosos para a agricultura (PELLEGRINO; ASSAD; MARIN, 2007).

Outro ponto de destaque é a maior vulnerabilidade ou a baixa capacidade dos países em desenvolvimento de se defender dos impactos das mudanças climáticas. A vulnerabilidade torna-se mais agravante quando se trata dos seus impactos sobre a agricultura desses países que são, de maneira geral, fortemente dependente das atividades agrícolas climáticas (GHINI; HAMADA, 2008).

Para que se possa combater ou se adaptar a esses impactos, um primeiro passo importante é buscar conhecê-los, definindo-se cenários agrícolas a partir de cenários futuros das mudanças climáticas.

2.1.6.1 Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta faz parte do espectro da radiação eletromagnética emitida pelo sol e é dividida em três faixas de onda diferentes: UVA - 400 a 320 nm; UVB – 320 a 290 nm e UVC – 290 a 200 nm. A UVC é totalmente absorvida pela camada de ozônio atmosférico; 90% ou mais de UVB é também absorvida pela camada de ozônio, enquanto a UVA passa através da atmosfera com pouca mudança. Porém a radiação UVB é a mais lesiva, sendo absorvida pelo DNA e causando mutações (LUCAS et al., 2006).

Quanto mais próximo da linha do Equador, maiores serão os níveis de radiação UV. Isso tona o Brasil, os demais países da América Latina e da África mais expostos que os países do hemisfério norte (OLIVEIRA et al., 2005).

2.1.6.1.1 Efeitos da radiação ultravioleta B em micro-organismos e mecanismos de proteção

A radiação solar ultravioleta B (280-320 nm) tem grave influência no metabolismo, crescimento e competição nos micro-organismos (PAUL et al., 1997), por causar danos diretos no DNA, incitando a formação de lesões no DNA celular, incluindo dímeros de pirimidina. Essas lesões resultam no bloqueio da replicação e transcrição do DNA e RNA, acúmulo de foto produtos, e na ausência dos mecanismos celulares eficientes para sua remoção pode ser letal (JACOBS; SUNDIN, 2001).

Uma análise detalhada das bactérias epifíticas presentes sobre plantas de amendoim, revelou que as bactérias tornaram-se tolerantes quando expostas a elevados fluxos de UV. Curiosamente, a proporção relativa de linhagens UV-tolerantes na comunidade bacteriana aumentou durante os períodos do dia quando as folhas foram expostas a uma quantidade maior de UV e as cepas mais tolerantes foram aquelas que produziram pigmentos rosa ou laranja (SUNDIN; JACOBS, 1999).

O *habitat* filosfera é um modelo mais simples dos efeitos de UV do que a rizosfera, a superfície foliar é regularmente previsível. Tem-se demonstrado que a comunidade bacteriana de filosfera de milho muda após a exposição à UV, e tem-se encontrado sequências de marcadores que irá nos permitir estender nosso entendimento sobre interações planta-bactéria (KADIVAR; STAPLETON, 2003).

Grandes incidências de radiação UV é uma das características mais proeminentes da superfície foliar, o que pode explicar uma característica marcante das bactérias epifíticas onde a grande proporção é pigmentada (JACOBS; SUNDIN, 2001; LINDOW; BRANDL, 2003; SUNDIN; JACOBS, 1999).

O sucesso ecológico das bactérias expostas à radiação ultravioleta é conferido pela capacidade dos organismos de efetivamente reparar danos no DNA, à

pigmentação de bactérias e fungos ou evitar a ocorrência de danos através do menor crescimento na copa das plantas e da colonização em sítios protegidos da UV, se disponível. Esses sítios protegidos são locais interiores das folhas da planta (WILSON et al., 1999) ou externos, locais sombreados fisicamente, como na base dos tricomas (JACOBS; SUNDIN, 2001).

Jacobs e Sundin (2001) demonstraram que a tolerância à radiação ultravioleta foi um fenótipo comum e que a colonização preferencial da comunidade bacteriana da filosfera de amendoim na parte abaxial da superfície foliar foi uma importante estratégia de sobrevivência.

Além do reparo por excisão, fotorreativação e acúmulos de carotenoides, que são causados pelos danos no DNA induzidos por UV-B, um importante mecanismo para evitar mutações é a síntese de compostos que absorvem a radiação ultravioleta (EHLING-SCHULZ; BILGER; SCHERER, 1997), como por exemplo, a produção de exopolissacarídeos (EPS).

Os exopolissacarídeos são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células ou são secretados para o meio de cultivo na forma de material viscoso. Como resultado da produção do exopolissacarídeo, ocorre mudança na viscosidade do meio de cultivo, começando como um fluido Newtoniano de baixa viscosidade e finalizando como um fluido não-Newtoniano, de elevada viscosidade (MOREIRA et al., 2005).

A produção de EPS por bactérias em superfícies foliares pode modificar o ambiente, produzindo uma camada que pode ancorar células na superfície e evitar a dessecação das células, bem como modificar o ambiente em torno da célula para que se torne mais favorável para o crescimento e sobrevivência (BEATTIE; LINDOW, 1999). A maioria dos micro-organismos tem a habilidade de sintetizar polissacarídeos e excretar para fora das células na forma de polímeros solúveis ou insolúveis cujas funções podem ser variadas.

A grande diversidade de estruturas e de micro-organismos produtores de EPS está relacionada às diferentes funções desempenhadas por essas moléculas. A existência desta matriz confere às células uma série de vantagens seletivas, tais como

a adesão às superfícies (BEVERIDGE; GRAHAM, 1991), proteção contra variações bruscas no macro ambiente, aumento da variabilidade antigênica, retenção de íons e nutrientes (COSTERTON et al., 1987), resistência à dessecação (ROBERSON; FIRESTONE, 1992) e proteção mecânica (SUTHERLAND, 2001). A verdadeira função dos EPS, contudo, depende da ecologia da célula bacteriana que o produz.

2.1.7 Microbiologia molecular no estudo de comunidades bacterianas

A aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucléicos (DNA ou RNA) presentes em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana, principalmente por permitir a análise de maneira independente do cultivo microbiano presentes nas amostras, o que exclui todos os problemas e limitações devido à baixa culturabilidade das comunidades bacterianas. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16S DNAr) é o mais amplamente utilizado, considerado importante para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS et al., 1999). A diversidade bacteriana foi acessada em vários ambientes baseando-se nos genes 16S DNAr das espécies microbianas componentes destas comunidades, revelando a grande diversidade que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados (PROSSER et al., 2007).

2.1.8 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

O PCR-DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas. A técnica separa *amplicons* de PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição de sequências em um gel com gradiente de desnaturação (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993).

Atualmente oligonucleotídeos grupo-específicos foram descritos, tendo como principais vantagens a acessibilidade de determinadas populações bacterianas separadamente e também uma melhor definição de perfis nas análises de comunidades bacterianas complexas. Alguns oligonucleotídeos selecionam grandes grupos bacterianos, como classes α e β -Proteobactéria (GOMES et al., 2001) e de maneira mais específica, foram desenvolvidos oligonucleotídeos para acessar populações mais restritas como por exemplo gêneros, dentre os quais podem ser citados *Pseudomonas* (WIDMER et al., 1998), *Paenibacillus* (DA SILVA et al., 2003) e *Burkholderia* (SALLES; DE SOUZA; VAN ELSAS, 2002). Todos estes oligonucleotídeos iniciadores, tanto universais como os grupos específicos, foram desenvolvidos tendo como base o gene 16S ribossomal.

Os produtos da amplificação são analisados em gel de eletroforese, o qual permite a separação dos *amplicons* de acordo com seus teores de G+C (MUYZER et al., 1993) Genes com teores distintos de G+C formam diferentes padrões de bandas, característicos de cada comunidade. Se outras informações forem necessárias, as bandas podem ser extraídas, clonadas, sequenciadas e essas sequências comparadas com sequências depositadas em bancos de dados.

2.1.9 Análise multivariada aplicada aos perfis de PCR-DGGE

Com a ampla utilização da técnica de PCR-DGGE no estudo de comunidades bacterianas, a simples comparação visual entre os perfis das comunidades passou a não fornecer toda informação possível de ser obtida por meio da aplicação desta técnica. Desta maneira os perfis de DGGE foram utilizados para aplicação de diferentes técnicas de análise, que se iniciou por comparação das curvas densitométricas e, posteriormente, na utilização dos dados (qualitativos ou quantitativos) gerados em análise multivariada.

A aplicação da análise multivariada em estudos de comunidades bacterianas é recente, tendo como principal vantagem a avaliação conjunta de vários fatores

envolvidos na determinação da composição das comunidades bacterianas de forma conjunta.

Para aplicação da técnica de análise multivariada em dados de PCR-DGGE, as imagens dos géis, normalizadas e convertidas, são transformadas em matrizes de presença/ausência de bandas que são consideradas a frequência de ocorrência destas espécies. Da mesma maneira, as intensidades relativas das bandas são consideradas a frequência de ocorrência destas espécies nas comunidades bacterianas a serem avaliadas (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

2.2 Material e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna-SP. Uma representação explicativa das etapas do trabalho pode ser visualizada na Figura 1.

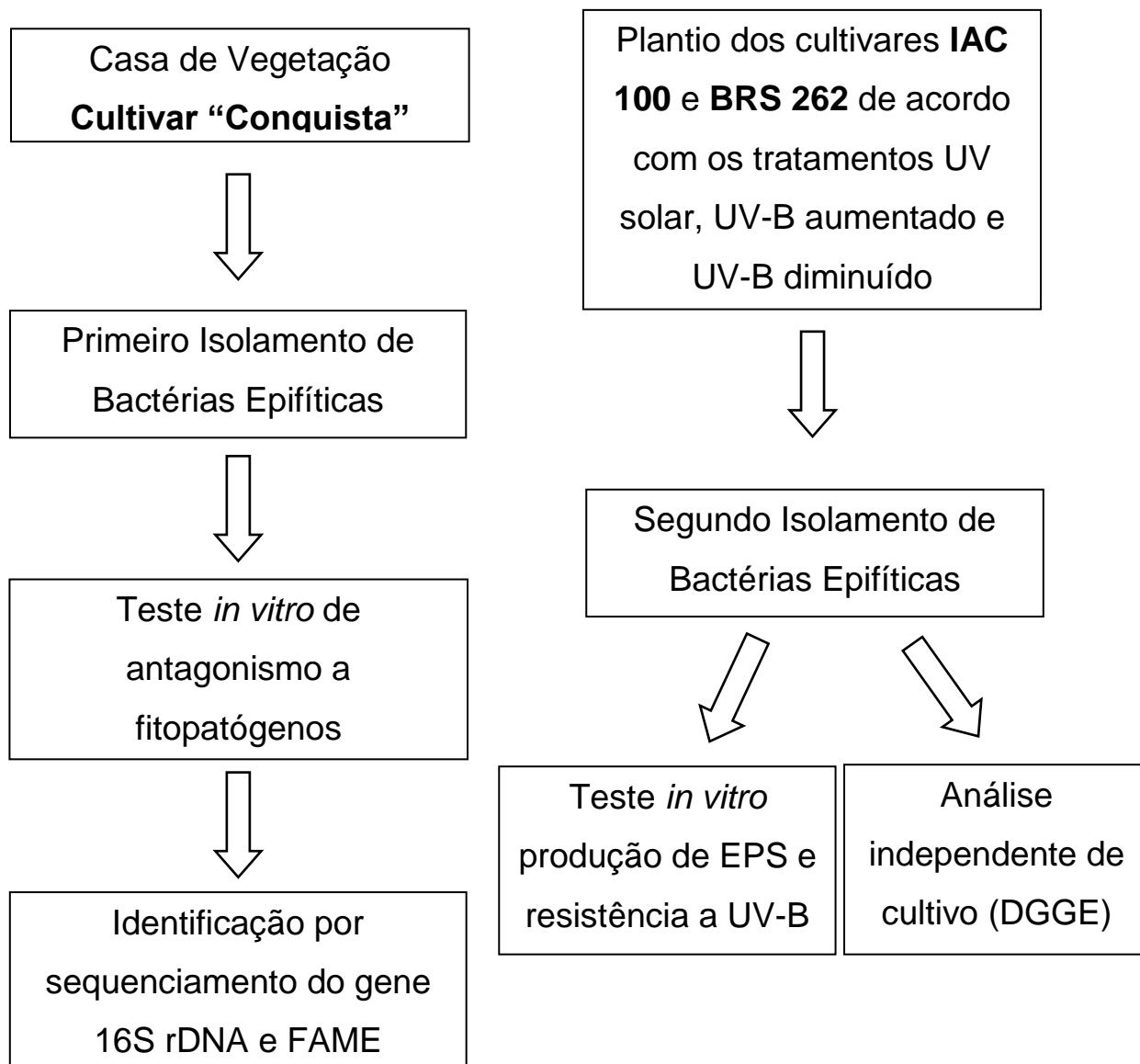


Figura 1 – Diagrama explicativo das etapas realizadas no trabalho

2.2.1 Isolamento de Bactérias Epifíticas da soja (cultivar “Conquista”)

Foram realizados dois isolamentos de bactérias epifíticas de soja para finalidades distintas. Neste primeiro foram isoladas bactérias para teste *in vitro* de antagonismo à fitopatógenos e o segundo isolamento foi para análise da diversidade bacteriana dos

dois genótipos de soja, tendo em vista os tratamentos de campo e teste de resistência dos isolados à radiação UV-B

A soja “Conquista” foi cultivada em casa de vegetação na EMBRAPA-Meio Ambiente, e durante o primeiro isolamento, as amostras da folha foram removidas e levadas em sacos plásticos para o laboratório, onde foram imediatamente processadas. Para o isolamento de bactérias epifíticas 10 discos de folhas de 1,76 cm² cada, foram colocados em frascos Erlenmeyer (500 ml) contendo 50 ml de tampão PBS (1,44 g/l de Na₂HPO₄; 0,24 g/l de KH₂PO₄; 0,20 g/l de KCl; 8,00 g/l de NaCl, pH 7,4). Estes frascos foram submetidos ao ultrassom por 30 seg. e mantidos sob agitação (100 rpm) a 25°C e por 2 h, sendo após este período preparadas diluições seriadas das suspensões celulares. Tais diluições foram semeadas em placas de cultivo contendo meio de cultura não seletivo TSA 10%, suplementado com o fungicida Imazalil (50 µg/ml). Estas placas foram incubadas a 25°C por 4-15 dias.

A população bacteriana por grama de tecido vegetal fresco (UFC/g TVF) foi estimada pela contagem de colônias cultivadas em meio TSA 10%. Colônias bacterianas foram repicadas das placas, purificadas e mantidas em TSA 10% suplementado com 20% de glicerol a -80°C (ARAÚJO, et al., 2002).

2.2.2 Avaliação da atividade de antagonismo

Ensaio de antagonismo *in vitro* foram realizados com o objetivo de verificar a capacidade de inibição do crescimento de 3 diferentes fungos fitopatogênicos (Tabela 2), por meio do método da cultura pareada ou pareamento (MARIANO, 1993). O isolado *F. solani* foi gentilmente cedido pela Coleção Micológica de Lavras da Universidade Federal de Lavras, e os outros dois foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente.

Tabela 2 - Fungos fitopatogênicos utilizados nos experimentos de antagonismo

Identificação	Espécie	Origem	Doença
F1	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Alface (SP)	Podridão Radicular
F2	<i>Rhizoctonia solani</i>	Tomate (SP)	Podridão Radicular
F3 (CML 1771)	<i>Fusarium solani</i>	Soja (MT)	Podridão Radicular Vermelha

Os fungos utilizados no experimento foram previamente desenvolvidos em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, pH 6,8 contendo 200 g de caldo de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar para cada 1000 mL de água destilada). Fragmentos circulares de 1 cm de diâmetro do meio de cultura com o fungo desenvolvido na superfície foram usados nos ensaios de antagonismo. Cada bactéria foi estriada em duas extremidades, a 1 cm da borda da placa de Petri com meio de cultura TSA e, 48 horas depois, cada fungo foi transferido para o centro da mesma placa (a uma distância de 3 cm de cada estria bacteriana). O controle do experimento consistiu em placa de Petri contendo apenas o fungo.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. As placas foram mantidas a 28°C, por tempo suficiente (cerca de seis dias) para que o fungo, no tratamento controle, apresentasse crescimento micelial suficiente para atingir a borda da placa. A determinação da capacidade de inibir fungos fitopatogênicos foi feita mediante a comparação visual dos tamanhos das colônias fúngicas dos experimentos (na mesma placa que as bactérias) e dos controles (placas contendo apenas os fungos). Foram considerados três tipos de interação entre bactérias e fungos: (1) sem inibição - SI, quando não houve qualquer mudança no tamanho ou na morfologia do fungo; (2) com halo de inibição - HI e (3) com ação fungistática - AF, quando o tamanho da colônia fúngica foi reduzido, ou quando, mesmo com o tamanho igual ao do controle, a produção de hifas foi reduzida.

2.2.3 Delineamento experimental

O experimento de campo com soja foi desenvolvido na EMBRAPA Meio Ambiente em Jaguariúna, Estado de São Paulo, situada nas coordenadas geográficas 22°43' de Latitude Sul e 47°01' de Latitude Oeste e uma Altitude de 584 m, onde foram montados 9 canteiros com estruturas metálicas, com dimensão de 4, 5 X 2 m cada. Nos canteiros foram plantadas duas cultivares de soja, IAC 100 e BRS 262, sob três tratamentos: radiação solar (controle positivo); UV-B diminuído (controle negativo) e UV-B aumentado (Figura 2). O delineamento experimental utilizado foram blocos casualizados, com os tratamentos em triplicata.

No tratamento UV-B aumentado, a radiação UV-B foi acrescida 4h por dia, por 8 unidades de lâmpadas fluorescentes (EL UVB-313, Q-Lab, EUA), envolvido com uma película de acetato de celulose (Crystal) para filtrar uma parte do espectro de UV-C (280-290 nm), posicionado a aproximadamente 40 cm acima do topo da copa das plantas. O filme de acetato de celulose foi trocado a cada 5 dias. Para o tratamento UV-B diminuído, as parcelas foram cobertas por um filme de poliéster (Du Pont) de 0,152 mm, que absorve toda a radiação UV-B. A irradiância foi medida por um espectrômetro (USB2000 + RAD, Ocean Optics, EUA). Ao longo do desenvolvimento da soja, a altura da lâmpada e do filtro foi ajustada para aproximadamente 40 cm de altura da copa das plantas.

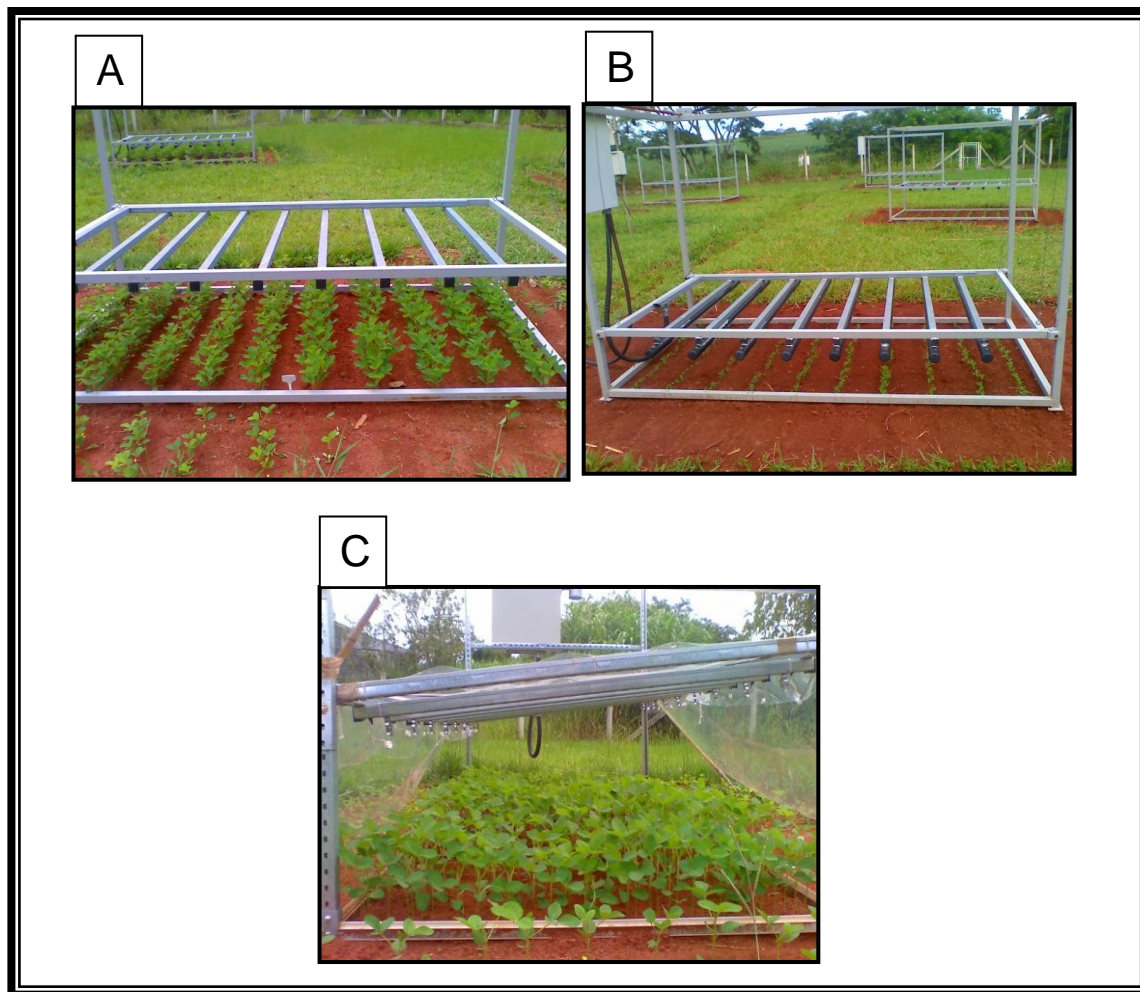


Figura 2 – Experimento de campo realizado na Embrapa Meio-Ambiente, (A) parcela com UV solar, (B) parcela com UV-B aumentado e (C) parcela sem UV-B

As parcelas foram constituídas por 10 linhas, com aproximadamente 15 sementes cada uma, sendo metade para o cultivar IAC 100 e a outra metade para o cultivar BRS 262. Ao redor das estruturas metálicas foram plantadas as bordaduras.

As sementes receberam um tratamento com inoculante turfoso (mistura comercial) de rizóbios fixadores de nitrogênio antes da semeadura. Isso foi necessário porque o solo em questão não havia histórico de cultivo de soja. E também precisou passar por correções devido à falta de alguns nutrientes como fósforo e potássio. A irrigação do solo foi feita por gotejamento, todos os dias, por aproximadamente uma hora.

A semeadura dos dois cultivares de soja foi efetuada no dia 15 de dezembro de 2009, sendo caracterizadas com ciclo precoce. A coleta do material vegetal foi realizada

em três fases de desenvolvimento, V3 (15 dias após a germinação), V6 (30 dias após a germinação) e R1 (60 dias após a germinação).

Para o isolamento de bactérias epifíticas da soja nos diferentes ciclos e tratamentos, as amostras foram removidas e levadas em sacos plásticos para o laboratório, onde foram imediatamente processadas.

Durante todo o experimento a radiação solar UV-B foi monitorada de 2 a 3 vezes por semana usando um espectrômetro (USB2000+RAD, Ocean Optics, EUA). O espectrômetro foi colocado aproximadamente na mesma altura do dossel, as leituras de UV solar foram integradas ao longo de 6 horas, produzindo uma saída quantitativa em kJ m^{-2} . A média das medições ao longo do experimento foi calculada e a quantidade de radiação UV-B solar recebida pelas plantas foi $6,82 \text{ kJ m}^{-2}/\text{dia}$.

As parcelas UV-B aumentado também foram monitoradas e as leituras foram integradas ao longo de 4 horas por dia, a média durante todo o experimento foi de $11,28 \text{ kJ m}^{-2}/\text{dia}$. Portanto, no tratamento UV-B aumentado houve um acréscimo médio de $4,46 \text{ kJ m}^{-2}/\text{dia}$ comparado com o tratamento UV solar (KADIVAR; STAPLETON, 2003; GUNASEKERA; PAUL; AYRES, 1997)

2.2.4 Isolamento de bactérias epifíticas de soja (cultivares IAC 100 e BRS 262)

O segundo isolamento foi para análise da diversidade bacteriana dos dois genótipos de soja, tendo em vista os tratamentos de campo e teste de resistência dos isolados à radiação UV-B, onde foi realizado com dois cultivares distintos de soja, IAC 100 e BRS 262, em dois estádios vegetativos diferentes V3, V6 e em um estágio reprodutivo R1, sendo as plantas crescidas sob três tratamentos: radiação solar (controle positivo), radiação UV-B diminuída (controle negativo) e radiação UV-B aumentada.

Durante o segundo isolamento, amostras da folha das cultivares de soja IAC 100 e BRS 262 foram removidas e levadas em sacos plásticos para o laboratório, onde foram imediatamente processadas. O protocolo obedeceu ao mesmo do item 2.2.1.

2.2.5 Identificação de bactérias epifíticas de soja por análise de ácidos graxos

Isolados de bactérias epifíticas de soja foram identificadas através do perfil de ácidos graxos do envoltório celular, por cromatografia gasosa modelo 6850 Agilent.

Para a extração de ácidos graxos houve cinco etapas: 1 - Coleta- recomendada que seja feita no 3º quadrante, aproximadamente quatro alças; 2 - Saponificação – o reagente de saponificação (metanol, NaOH, H₂O) e alta temperatura provocam a morte e lise das células; 3 - Metilação – converte os ácidos graxos em metil ésteres de ácidos graxos, que apresentarão maior volatilidade para análise de cromatografia gasosa; 4 - Extração – metil ésteres de ácidos graxos são removidos da fase aquosa e transferidos para a fase orgânica pelo procedimento de extração líquido-líquido; 5 - Lavagem – o reagente de lavagem é adicionado para remover ácidos graxos livres e resíduos de reagentes.

Para identificação das bactérias epifíticas utilizando o padrão de ácidos graxos, estas, foram cultivadas em meio TSA, pelo método de estrias cruzadas e incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 ± 2 horas. Decorrido este tempo, foram coletados, aproximadamente, 40 mg (quatro a seis alças com capacidade para 10 μL) da cultura no 3º quadrante e transferidos para tubos Kimax (100X13 mm). Depois, foram executadas as quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares (saponificação, metilação, extração e lavagem). Foi utilizado o cromatógrafo gasoso com injetor automático (modelo 6850, Agilent), e detector Flame Ionization Detector (FID) (modelo 7683, Agilent). A interface foi obtida pelo programa ChemStation A. 09.01[1206] e o método e a biblioteca selecionada foram TSBA 40.

2.2.6 Extração de DNA genômico bacteriano

As linhagens foram cultivadas em 5 ml de TSB 10% por 24 horas a 25°C sob agitação de 150 rpm. Dois a 4 ml da cultura foram centrifugados por 5 minutos a 14000 *g* e as células ressuspendidas em 500 μl de TE (10 mM de Tris-HCl; pH 8,0), centrifugadas e ressuspendidas em 500 μl de TE com o acréscimo de 0,5 g de pérolas

de vidro (0,1 mm de diâmetro - Sigma) e 15 µl de SDS 20%. As células foram agitadas em um homogeneizador (*Mine-BeadbeaterTM*, *Biospec Products*) por 30 s a 350 bpm. Ao lisado celular foram adicionados 500 µl de fenol, homogeneizados por inversão e centrifugado por 5 min a 14000 g. A fase aquosa foi extraída uma vez com fenol-clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio, então, o DNA foi precipitado com 1/10 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol (3 min à temperatura ambiente) e coletado por centrifugação (10 min a 14000 g). O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 37°C e ressuspendido em 50 µl de água ultrapura esterilizada. O DNA total foi analisado por eletroforese em gel de agarose (0,8% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com brometo de etídio (0,5 500 µg/ml), segundo Sambrook et al. (2001).

2.2.7 Amplificação do gene 16S DNAr

O DNA extraído foi utilizado para a amplificação do gene 16S ribossomal (16S DNAr) em reação de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores R1387 (5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3') e P027F (5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'). As reações foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1 µL de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C; 1 min a 62,5°C; 1 min a 72°C, e uma extensão final de 7 min a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,0% a 3 V.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz ultravioleta.

2.2.8 Purificação do produto de PCR

Os produtos de PCR gerados com os oligonucleotídeos R1387 e P027F foram purificados adicionando 1 mL de isopropanol gelado, seguido de centrifugação a 14000 g, após foram adicionados 125 µL de etanol 80%, depois da secagem do etanol foram adicionados 30 µl de água ultrapura esterilizada. Posteriormente os fragmentos de DNA foram enviados para serem parcialmente sequenciados em sequenciador automatizado ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA). As sequências obtidas serão utilizadas para identificação filogenética dos isolados nos bancos de dados *Ribosomal Data Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e também por meio da análise de *BLASTn* no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.9 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Para verificar a produção de EPS, os isolados bacterianos obtidos foram inoculados em discos de 5 mmØ em meio de cultura modificado de Guimarães (1999) (2% de extrato de levedura; 1,5% K₂HPO₄; 0,02% MgSO₄; 0,0015% MnSO₄; 0,0015% FeSO₄; 0,003% CaCl₂; 0,0015% NaCl; 1,5% agar) adicionado de 10 % de quatro diferentes fontes de carbono (trealose, manitol, maltose, e sacarose). A produção de EPS foi caracterizada visualmente mediante medida do halo do EPS produzido, sendo + (pouca produção - halo de EPS ≤ 10 mmØ), ++ (média produção - halo de EPS de 10-14 mmØ) e +++ (ótima produção - halo de EPS ≥ 14 mmØ). A produção deste biopolímeros pelos isolados foi confirmada pelo método químico, misturando uma alça de Platina impregnada pela colônia em 2 mL de álcool absoluto.

2.2.10 Teste de resistência de bactérias epifíticas à radiação UV-B

A sensibilidade a UVR foi avaliada através da determinação da dose mínima inibitória (MID) de radiação UV-B (pico em 310 nm), necessária para inibir o

crescimento de células em placas de TSBA. As células foram preparadas em meio TSB a uma densidade de 10^8 ufc/mL. As células foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e cerca de 10^4 células foram plaqueadas (25 μ L) em triplicatas em meio TSBA 10%.

As lâmpadas (EL UVB-313, Q-Lab, EUA) foram envolvidas por uma película de acetato de celulose (Crystal) para filtrar uma parte do espectro de UVC (280-290 nm), e a irradiância foi medida por um espectrômetro (USB2000+RAD, Ocean Optics, EUA). De acordo com as condições utilizadas neste estudo, a energia de saída das lâmpadas eram aproximadamente $0,52 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Figura 3).

A lâmpada foi ligada 15 minutos antes do uso para permitir a estabilização da radiação. As placas com os isolados foram expostas por 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos, e foram casualizadas a cada 30 min. Após a dose de UV, as placas foram incubadas por 72 horas a 25°C no escuro, para minimizar a fotorreativação, onde se fez a contagem das UFC. A MID foi designada como a dose de UV que resultou em uma inibição do crescimento em comparação com as células crescidas nas placas não irradiadas e com o controle de sensibilidade *Echerichia coli* (KUHLMAN et. al, 2005).

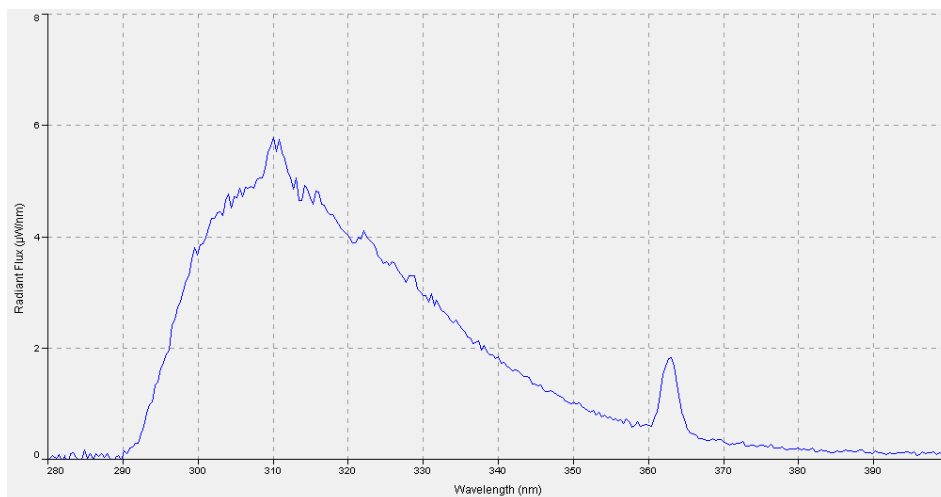


Figura 3 – Irradiância espectral da lâmpada (EL UVB-313, Q-Lab, EUA) utilizada para o teste de resistência à UV-B, medida através do espectrômetro USB2000+RAD, Ocean Optics, EUA

2.2.11 Análise por meio da técnica de PCR-DGGE

Na técnica de PCR-DGGE, o DNA extraído diretamente da amostra ambiental foi utilizado para amplificação e posterior separação dos fragmentos gerados em gel com gradiente desnaturante.

Primeiramente uma reação de PCR específica foi realizada contendo 1 µL da amostra de DNA extraído em 35 ciclos de amplificação com os oligonucleotídeos seletivos para os grupos Bacteria e β-Proteobacteria. As reações para cada grupo foram realizadas separadamente e em combinação com o oligonucleotídeo 1492R, para β-Proteobacteria foi utilizado o oligonucleotídeo Beta-2 (GOMES et al., 2001). Os iniciadores seletivos para *Pseudomonas* spp. (GARBEVA et al., 2004) foram utilizados conforme descrito pela literatura.

O produto de amplificação dos grupos acessados foi utilizado com o DNA molde na segunda reação de PCR para amplificação com os iniciadores para DGGE. Estas reações foram realizadas em volume de 50 µL contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde e 400 nM de cada oligonucleotídeo universal U968-GC e R1378 utilizando 35 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 55°C.

A amplificação de *Pseudomonas* spp. foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores específicos U986-GC e R1459 utilizando 29 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 55°C. O produto da PCR de todos os grupos foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão TAE 1x, com posterior coloração com brometo de etídio (1,0 mg/l⁻¹) e visualização sob luz ultravioleta.

O DGGE foi realizado conforme Heuer et al. (1997) com equipamento phorU2 system (Ingeny, Goes, Holanda). O produto de amplificação da segunda reação foi aplicado em gel de poliácridamida (6,0% p/v) em tampão TAE 1x. Este gel foi preparado com gradiente desnaturante variando de 45% a 65% (onde 100% de desnaturação significam concentração de 7M de uréia e 40% de formamida). Os géis foram submetidos à eletroforese vertical por 16 h a 100 V à temperatura de 60°C e posteriormente foi corado com nitrato de prata e fotografado.

2.2.12 Análise estatística

As análises referentes aos dados de isolamento das comunidades bacterianas foram realizadas utilizando o software SAS (Copyright © 1989-1996 by SAS Institute, USA), com a análise de variância aplicada a um experimento fatorial ($P < 0.05$), considerando o tempo de cultivo, diferentes plantas utilizadas e os diversos tratamentos. As contagens bacterianas foram transformadas por meio do cálculo $\log_{10}X+1$ anteriormente a análise de variância.

Os perfis de DGGE obtidos foram analisados e comparados no programa BioNumerics versão 6.01 (Applied Maths, Bélgica), no qual os perfis foram alinhados de acordo com um padrão externo, permitindo o alinhamento e a análise conjunta de diferentes géis. As bandas foram identificadas e as áreas referentes a cada banda foram quantificadas de maneira relativa ao total de área da amostra, permitindo a normalização e posterior comparação entre as amostras.

A correlação dos dados ambientais com a ocorrência das bandas e suas intensidades foram determinadas pela Análise Canônica de Correspondência (CCA), realizada no *software* Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda). AS bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e suas intensidades relativas consideradas como frequência de ocorrência destas espécies.

2.3 Resultados

2.3.1 Isolamento de bactérias epifíticas de soja

Durante o primeiro isolamento, foram selecionados diferentes grupos morfológicos de forma aleatória, resultando em 60 isolados bacterianos epifíticos de folha do cultivar “Conquista”, os quais foram utilizados para os testes *in vitro*.

2.3.2 Ensaio de antagonismo

Dos 91 isolados bacterianos avaliados com a capacidade de inibição contra três fungos fitopatogênicos: *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* e *Fusarium solani*, 28 apresentaram algum tipo de ação de controle sobre, pelo menos, um dos fitopatógenos, equivalente a 30,7%. Os resultados das interações entre as bactérias e os fungos são apresentados na Tabela 3. Os isolados não citados na Tabela 3 não demonstraram qualquer ação sobre os fungos (classificados como SI - sem inibição).

Tabela 3 – Tipos de interação entre os isolados bacterianos epifíticos da folha de soja e fungos fitopatogênicos

(continuação)		
Isolados	Fitopatógenos	Tipo de interação*
<i>Salmonella</i> sp. (EPj 1)	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
<i>Ewingella americana</i> (EPj2)	<i>R. solani</i> (tomate)	AF
EPj 5	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	AF
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (EPj 8)	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
<i>Pseudomonas putida</i> (EPa 11)	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	HI
	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
	<i>F. solani</i> (soja)	HI
<i>Salmonella</i> sp. (EPa 12)	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	HI
	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
<i>Shigella sonnei</i> (EPa 13)	<i>F. solani</i> (soja)	HI
	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
<i>Pseudomonas</i> sp. (EPa 14)	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
	<i>F. solani</i> (soja)	HI
<i>Shigella sonnei</i> (EPa 15)	<i>R. solani</i> (tomate)	AF
<i>Chryseobacterium</i> sp. (EPj 20)	<i>R. solani</i> (tomate)	AF

Tabela 3 – Tipos de interação entre os isolados bacterianos epifíticos da folha de soja e fungos fitopatogênicos (conclusão)

Isolados	Fitopatógenos	Tipo de interação*
EPj 21	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	HI
<i>Nocardia brasiliensis</i> (EPj 25)	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	AF
<i>Sphingomonas sp.</i> (EPj 29)	<i>R. solani</i> (tomate)	AF
	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	HI
EPj 30	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
	<i>F. solani</i> (soja)	AF
<i>Serratia sp.</i> (EPa 36)	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	HI
	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
	<i>F. solani</i> (soja)	HI
<i>Salmonella sp.</i> (EPa 37)	<i>R. solani</i> (tomate)	HI
EPa 40	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	HI
	<i>R. solani</i> (tomate)	AF
<i>Enterobacteriaceae</i> (EPa 41)	<i>P. aphanidermatum</i> (alface)	AF
	<i>F. solani</i> (soja)	AF
EPf 52	<i>R. solani</i> (tomate)	AF

* Tipos de interação: HI – Halo de inibição; AF – Ação fungistática

Alguns isolados bacterianos tiveram ação sobre todos os três fitopatógenos avaliados, como *Salmonella sp.* (EPa 12), *Pseudomonas putida* (EPa 11), EPj 30 (não-identificado) e *Serratia sp.* (EPa 36)

Todos os isolados dos gêneros *Salmonella* e *Pseudomonas* mostraram ter efeito antagonista contra o fungo *Rhizoctonia solani*, com diferentes tipos de interação.

O fitopatógeno que obteve menor número de antagonistas foi *Fusarium solani*, dentre os quais se encontram cinco linhagens da família Enterobacteriaceae: *Serratia*

sp., *Salmonella* sp., EPa 41 e duas do gênero *Pseudomonas*, além do isolado EPj 30 (não identificado), sendo 2 com ação fungistática e 4 com presença de halo de inibição (Figura 4)

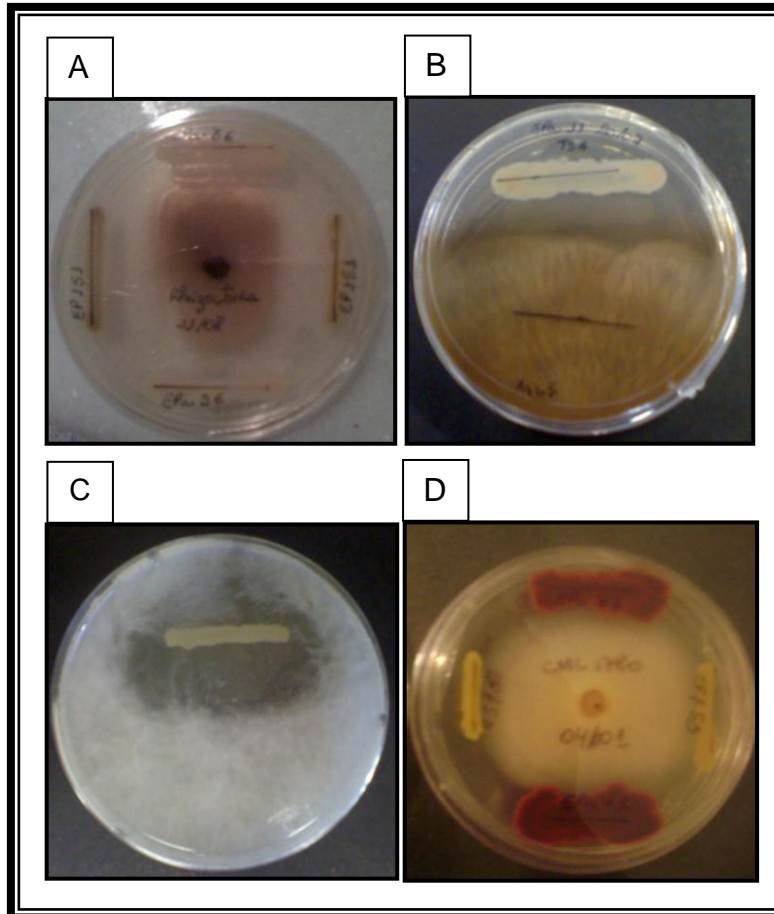


Figura 4 - Pareamento de cultura dos isolados epifíticos de soja frente à fitopatógenos. (A) Halo de inibição contra *R. solani* formado pelos isolados EPa 36; (B) halo de inibição contra *R. solani* formado pelo isolado EPa 11; (C) halo de inibição formado contra *P. aphanidermatum* pelo isolado EPj 30 e (D) Ação fungistática contra *F. solani* pelos isolados EPj 30 e *Salmonella* sp. (EPa 41)

2.3.3 Isolamento de bactérias epifíticas da folha de soja (IAC 100 e BRS 262) dos experimentos de campo

A contagem da densidade total da comunidade bacteriana epifítica variou em torno de 10^3 a 10^4 UFC/g de tecido vegetal fresco (TVF). Porém, esta densidade sofreu

interação com alguns fatores analisados, tais como, cultivar e estádios de desenvolvimento do hospedeiro.

Em relação aos diferentes tratamentos com radiação, não houve diferença significativa na densidade bacteriana epifítica total (Figura 5).

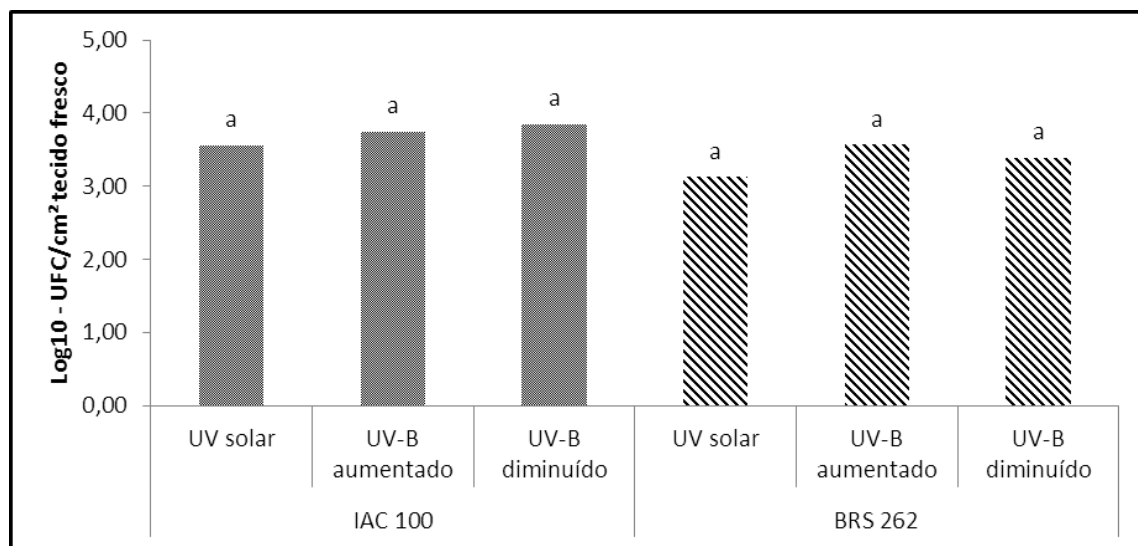


Figura 5 – Densidade populacional total da comunidade bacteriana epifítica de soja durante as fases V3; V6 e R1, nas cultivares IAC 100 e BRS 262. Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P > 0.01$)

Foi observado que os estádios fisiológicos V3, V6 e R1, alteraram significativamente a densidade populacional bacteriana. A fase R1 (florescimento) apresentou maior densidade populacional epifítica bacteriana (Figura 6)

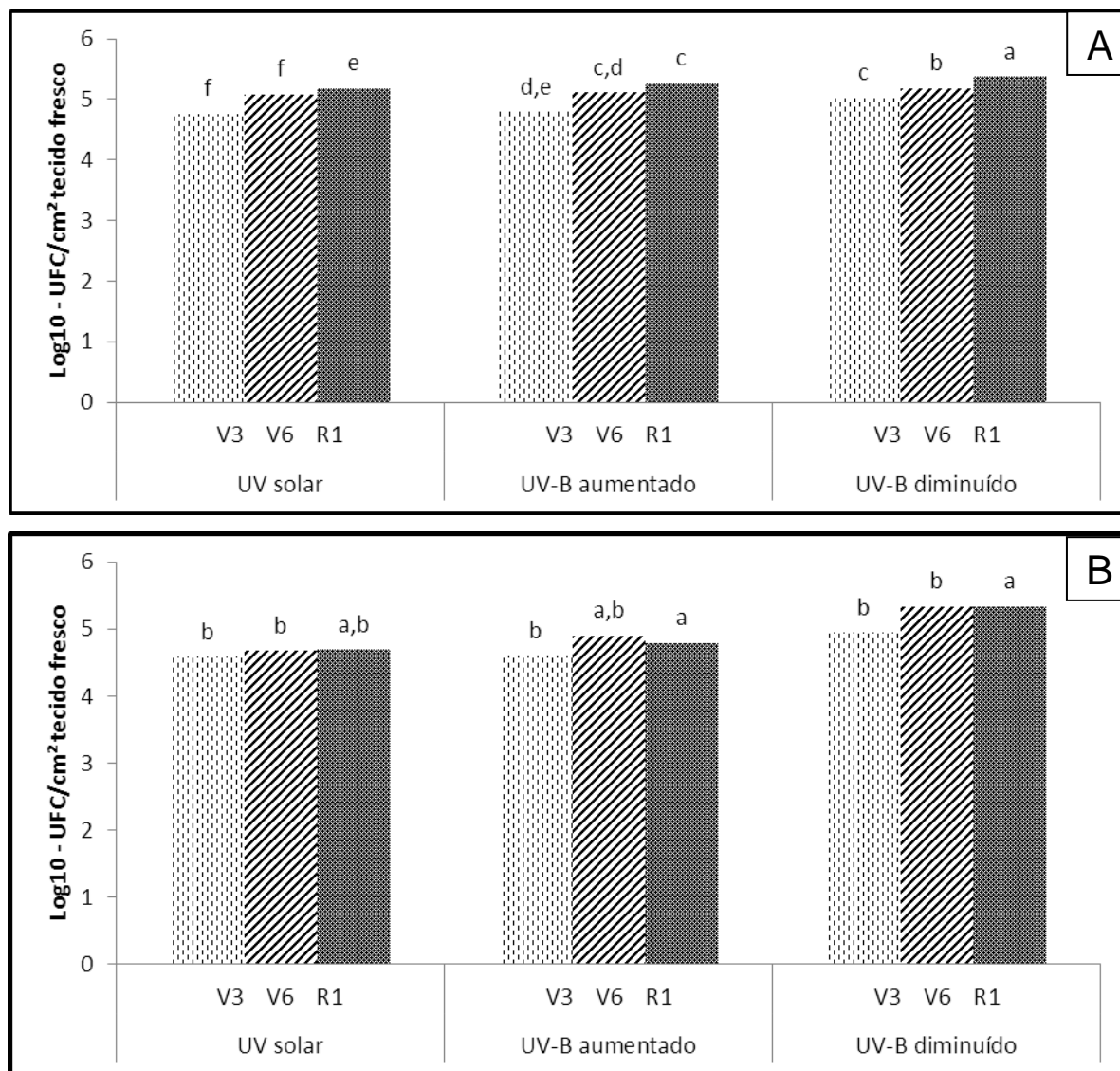


Figura 6 – Densidade populacional total da comunidade bacteriana epifítica das cultivares IAC 100 (a) e BRS 262 (B) de soja, durante as fases: V3; V6 e R1 sob radiação UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído. Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P > 0.01$)

Ao mesmo tempo observou-se que a característica da pigmentação na comunidade bacteriana epifítica de soja apresentou diferenças de acordo com o cultivar (figura 7), pois a porcentagem de isolados pigmentados foi superior à de isolados não pigmentados no cultivar IAC 100 enquanto que no cultivar BRS 262 não houve diferença significativa.

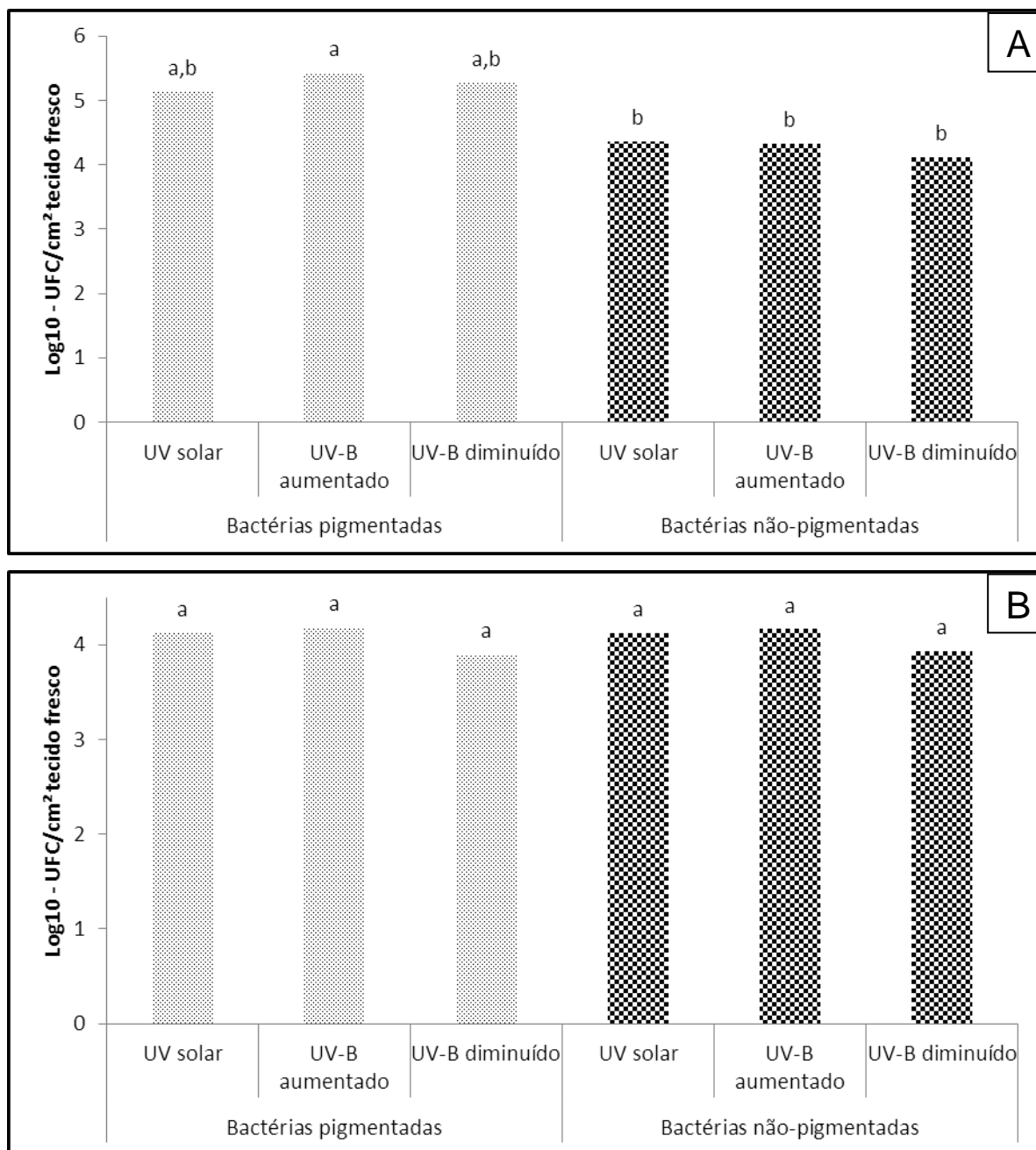


Figura 7 - Densidade populacional total da comunidade bacteriana epifítica pigmentada e não pigmentada dos cultivares IAC 100 (A) e BRS 262 (B) de soja, sob radiação UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído. Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P > 0.01$)

Após a contagem, foram selecionados diferentes grupos morfológicos de forma aleatória, resultando em 280 isolados epifíticos de folha dos cultivares IAC 100 e BRS 262 cultivadas sob radiação UV solar, radiação UV-B aumentada e radiação UV-B diminuída, durante três estádios de desenvolvimento do hospedeiro (V3, V6 e R1).

2.3.4 Identificação de bactérias epifíticas de soja por análise de ácidos graxos (FAME) e o gene 16s rDNA.

As relações filogenéticas entre as bactérias epifíticas foram obtidas por meio da análise da sequência parcial do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (16S DNA). As sequências dos isolados foram alinhadas e analisadas pelo BLASTn.

As bactérias epifíticas do primeiro isolamento foram identificadas por sequenciamento parcial do gene 16S e pela análise de ácidos graxos, a Tabela 4 demonstra a identificação, a técnica utilizada e os valores de similaridade.

Tabela 4 - Identificação das bactérias epifíticas isoladas da soja "Conquista"

Código	Identificação	Técnica	(continuação)
			Sim INDEX (FAME) Max ident. (16S rDNA)
EPj 1	<i>Salmonella</i> sp.	FAME	0,765
Epj 2	<i>Ewingella</i> sp.	FAME	0,529
Epj 5	não encontrado na biblioteca	FAME	-
Epj 8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FAME	0,973
Epa 11	<i>Pseudomonas putida</i>	FAME	0,896
EPa 12	<i>Salmonella</i> sp.	FAME	0,854
Epa 13	<i>Shigella sonnei</i>	FAME	0,639
EPa 14	<i>Pseudomonas</i> sp.	16S rDNA	96%
Epa 15	<i>Shigella sonnei</i>	FAME	0,756
EPj 20	<i>Chryseobacterium</i> sp.	16S rDNA	97%
EPj 25	<i>Nocardia brasiliensis</i>	FAME	0,653
EPj 29	<i>Shingomonas</i> sp.	16S rDNA	96%
EPj 30	não encontrado na biblioteca	FAME	-
EPa 33	<i>Kineococcus</i> sp.	16S rDNA	97%
EPa 35	<i>Microbacterium</i>	16 S rDNA	97%

Tabela 4 - Identificação das bactérias epifíticas isoladas da soja “Conquista”

(conclusão)

Código	Identificação	Técnica	Sim INDEX (FAME)
			Max ident. (16S rDNA)
EPa 36	<i>Serratia</i> sp.	16S rDNA	98%
EPa 37	<i>Salmonella</i> sp.	FAME	0,661
Epa 40	-	FAME	0,200
Epa 41	Enterobacteriaceae	FAME	0,577
EPa 48	<i>Agrococcus</i> sp.	16S rDNA	93%
EPf 50	<i>Phycibacter</i> sp	16S rDNA	94%
EPf 51	<i>Phycibacter jejuensis</i>	16S rDNA	96%

2.3.5 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

Dentre as 60 bactérias epifíticas de soja do segundo isolamento, 22 cresceram e produziram EPS em pelo menos um dos quatro diferentes tipos de fontes de carbono (sacarose, trealose, maltose e manitol), testados neste estudo, como demonstra a Tabela 5.

De acordo com a medição do halo na produção de EPS, maior porcentagem de produção pelos isolados foi com o açúcar manitol, com 86,3%. Dentro deste, 13,6% obtiveram ótima produção, 18,1% obtiveram média produção e 54,4% obtiveram pouca produção. E a fonte de açúcar maltose foi a que apresentou a menor de produção, com 68,1%, sendo que 50% obtiveram pouca produção e 18,1% obtiveram média produção.

Como exposto na Tabela 5, os tratamentos de campo de onde as linhagens foram obtidas, UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído, a produção de EPS foi 67,7%, 82,5% e 75% respectivamente.

Tabela 5 – Avaliação* da produção de EPS por bactérias epifíticas de soja em diferentes fontes de carbono

Tratamentos	Isolados	Sacarose	Trealose	Maltose	Manitol
UV Solar	EP 250	+	+	+	+
	EP 147	+	+	+	+
	EP 265	+	++	+	+
	EP 151	++	++	++	++
	EP 161	-	-	-	++
	EP 95	-	-	-	+
	EP 96	-	-	-	+
UV-B +	EP 209	+++	++	++	+++
	EP 225	+	+	-	+
	EP 226	+	+	+	+
	EP 139	+	+	+	+
	EP 23	+++	+++	+	+++
	EP 242	+	++	+	+
	EP 240	++	++	+	+
	EP 35	+	+	-	+
	EP 134	-	-	+	-
	EP 215	-	-	+	-
UV-B -	EP 181	++	++	++	++
	EP 188	+	++	++	+
	EP 116	+	-	-	+++
	EP 11	++	+++	+	++
	EP 10	-	+	-	-

* +++ ótima produção; ++ média produção; + pouca produção; - sem produção

2.3.6 Avaliação *in vitro* da resistência de bactérias epifíticas à radiação UV-B

Oito isolados foram selecionados de acordo com a produção de EPS, pigmentação e com o tratamento de campo para avaliar a resistência à radiação UV-B, com pico em 310 nm, como mostram as Figuras 8 e 9.

Alguns isolados demonstraram resistência para produzir colônias em placas de TSA depois da exposição por 150 min (4720 J m^{-2}) de radiação UV-B, comparado com o controle *E. coli* que foi sensível já nos primeiros 30 min (940 J m^{-2}).

Os isolados produtores de EPS (EP 209 e EP 188) e os pigmentados (EP 10, EP 139, EP 242 e EP 96) sobreviveram à exposição a 4720 J m^{-2} , com porcentagem de sobrevivência de 85% (EP 209), 40% (EP 188), 43,9% (EP 10), 63% (EP 139), 80% (EP 242) e 27% (EP 96).

De acordo com os dados, os isolados com pigmentação laranja e rosa, EP 242 e EP 139, respectivamente, são os que possuem maior resistência quando comparados aos que produzem pigmento amarelo, EP 96 e EP 10.

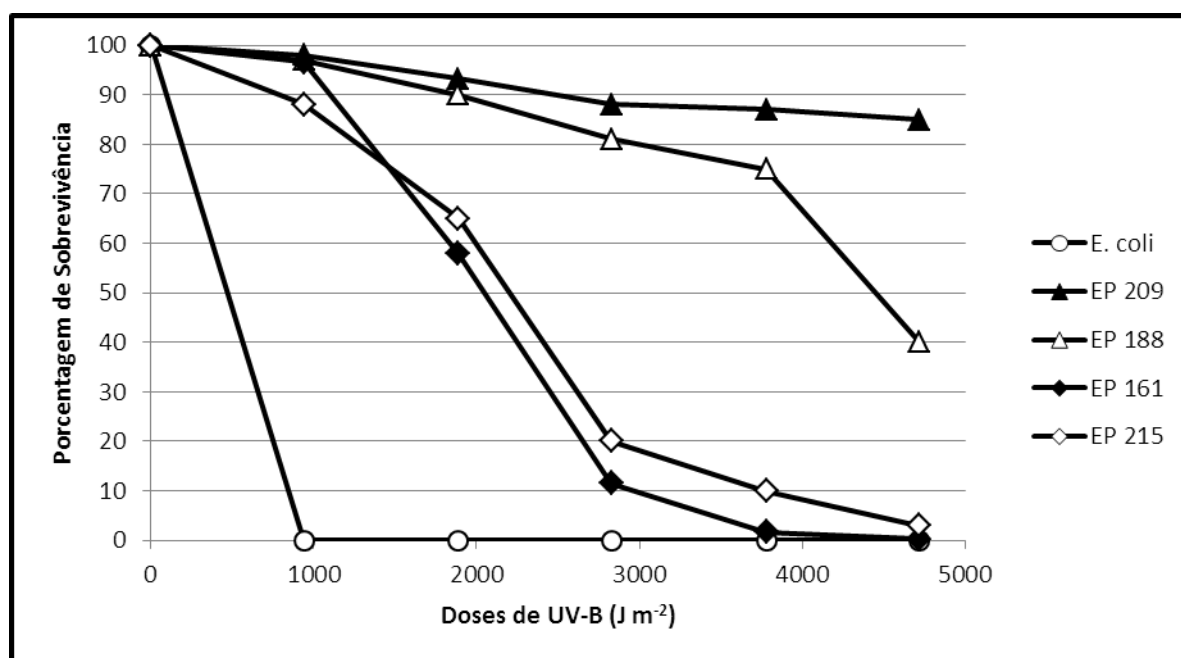


Figura 8 – Sobrevivência de isolados não pigmentados da filosfera de soja após irradiação com UV-B, onde EP 209 (▲) e EP 188 (△) são bons produtores de EPS. Cada ponto representado significa as triplicatas do experimento

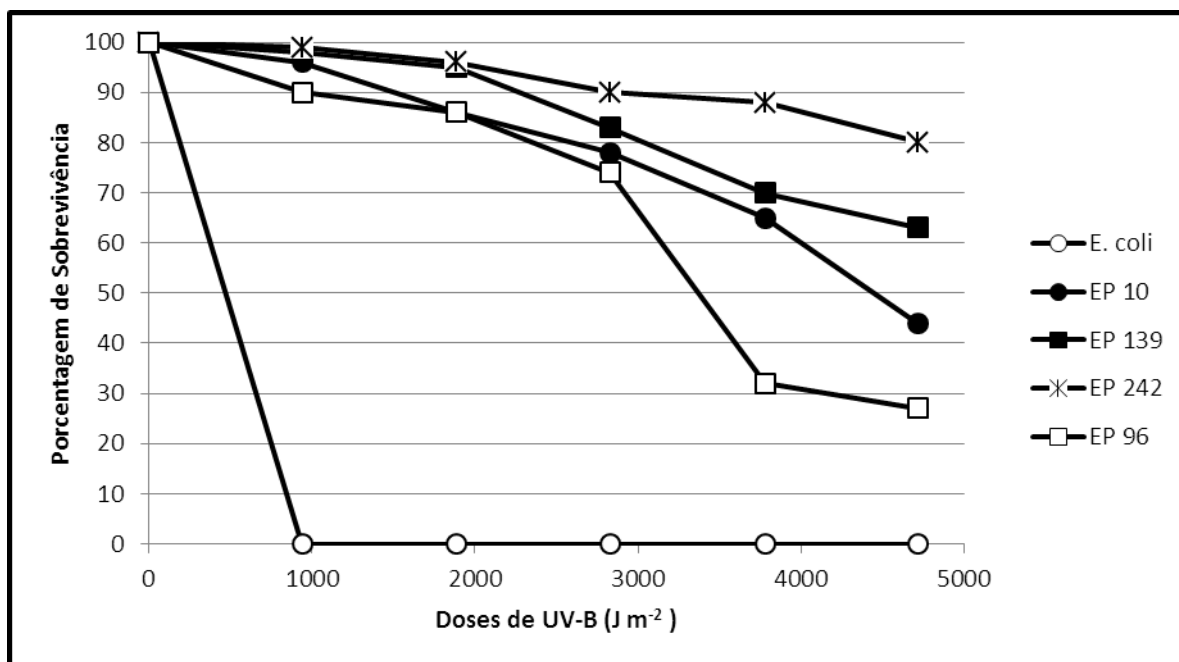


Figura 9 - Sobrevivência de isolados pigmentados da filosfera de soja após irradiação com UV-B, onde EP 10 (●) e EP 96 (□) produzem pigmentos amarelos, EP 139 (■) produz pigmento rosa e EP 242 (✱) produz pigmento laranja. Cada ponto representado significa as triplicatas do experimento

2.3.7 Análise de DGGE da comunidade bacteriana epifítica de soja

A análise de DGGE da comunidade bacteriana epifítica foi realizada em amostras de folhas dos cultivares IAC 100 e BRS 262, nos estádios de desenvolvimento vegetal V3, V6 e R1, além dos diferentes tratamentos em campo (UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído). Os perfis de DGGE obtidos foram convertidos e analisados por meio de metodologias multivariadas, correlacionando a ocorrência das bandas com as variáveis ambientais.

A análise de redundância (RDA) mostrou a interação da distribuição das espécies (banda nos perfis de DGGE) com os fatores ambientais determinantes (Figura 10). A principal variável interferindo na composição da comunidade bacteriana epifítica de soja foi o estágio de desenvolvimento. Com valores de lambda-1 o grupo Bacteria de 0,26 e 0,22; o grupo β -Proteobactéria 0,29 e 0,17 e o gênero *Pseudomonas* foram 0,12 e 0,20 para as análises das cultivares IAC 100 e BRS 262, respectivamente. Isto levou a separação das amostras no primeiro eixo de acordo com os estádios de

desenvolvimento. Considerando a separação no segundo eixo, é possível observar a separação pelos tratamentos, porém sem significância estatística ($p > 0,05$), sendo tal variável apresentada com valores menores de $\lambda-1$, variando entre 0,02 e 0,06, para cada tratamento de irradiação avaliado (Tabela 6).

Tabela 6 – Variância explicada por cada uma das variáveis ambientais nas comunidades bacterianas da filosfera dos cultivares IAC 100 e BRS 262 de soja. A composição das comunidades foi avaliada por meio de perfis de bandas de DGGE obtidos com amplificação com oligonucleotídeos para o domínio Bacteria, para o grupo β -Proteobacteria e o gênero *Pseudomonas*

Variável ambiental	IAC 100		BRS 262		Grupos
	Lambda-1	p value	Lambda-1	p value	
Estádio de desenvolvimento	0,26	0.002	0,22	0.002	Bacteria
	0,29	0.002	0,17	0.002	β-Proteobacteria
	0,12	0.008	0,2	0.004	<i>Pseudomonas</i>
Irradiação	0,05	0.142	0,06	0.062	Bacteria
	0,05	0.102	0,04	0.368	β-Proteobacteria
	0,02	0.688	0,04	0.312	<i>Pseudomonas</i>

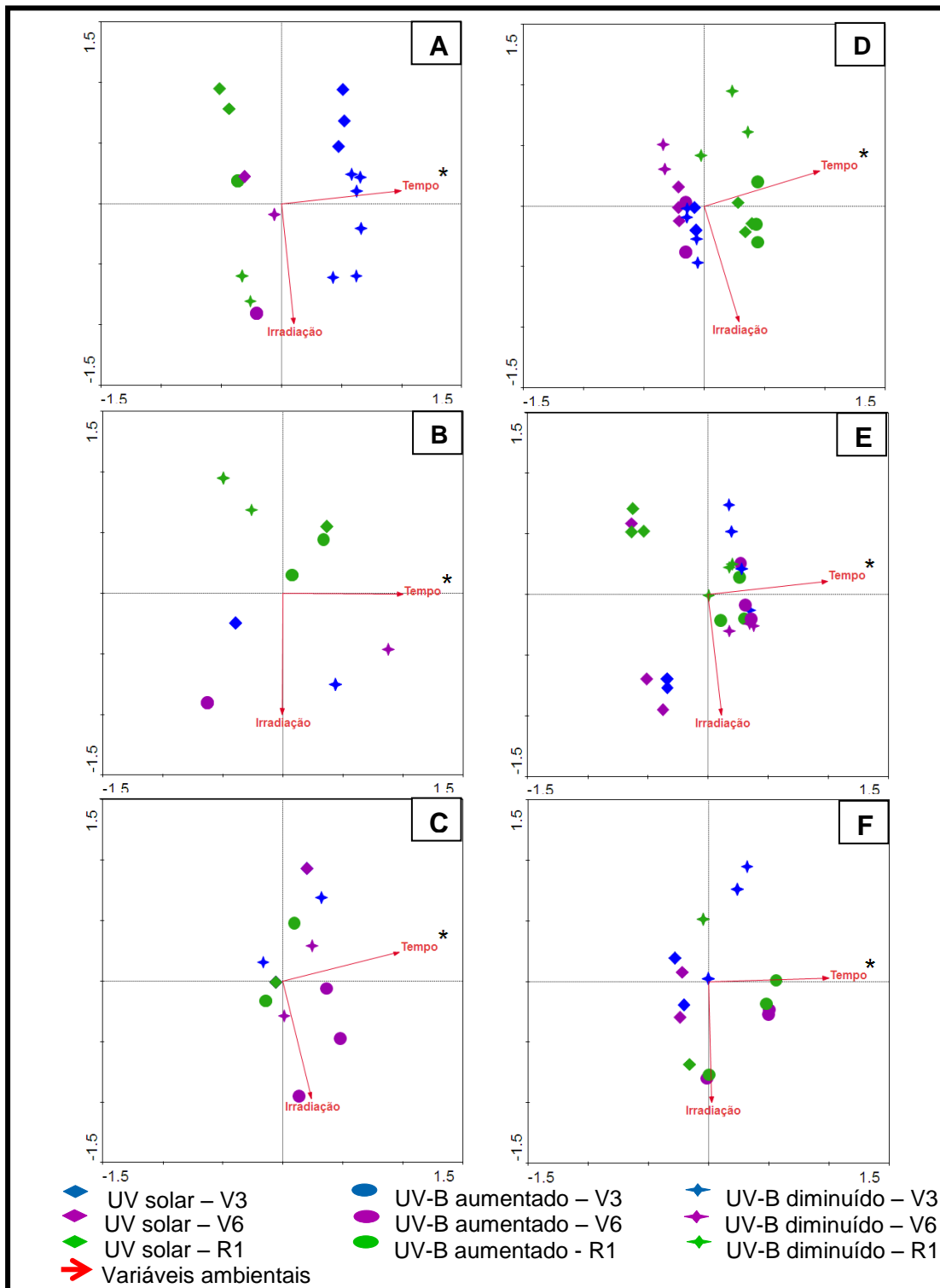


Figura 10 – Análise de redundância (RDA) entre o perfil de bandas de DGGE, obtidos das amostras de folhas de soja dos cultivares IAC 100 (A, B e C) e BRS 262 (D, E e F), com oligonucleotídeos universais para Bactéria (A e D); específicos para β -Proteobactéria (B e E) e para o gênero *Pseudomonas* (C e F). O fator ambiental marcado com * foi significativo para determinar a composição das comunidades bacterianas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de permutação de Monte Carlo

Os resultados mostram que as diferenças nas estruturas das comunidades microbianas na filosfera estudadas estão correlacionadas com o estágio de desenvolvimento (tempo de cultivo) das plantas para grupos Bacteria e β -Proteobacteria, porém para o gênero *Pseudomonas*, teve um valor de correlação menor com esse atributo.

Em relação às comunidades bacterianas da filosfera de cada cultivar, é possível observar um comportamento análogo de acordo com fatores ambientais analisados, sendo as separações dos grupos analisados (Bacteria, β -Proteobacteria, e *Pseudomonas*) similares nos dois cultivares analisados.

As amostras de Bacteria foram plotadas de forma mais dispersa em relação ao estágio de desenvolvimento, porém mantendo a ordenação similar à plotada para a comunidade de β -Proteobacteria. Desta forma, a distribuição da estrutura das comunidades de Bacteria seguiu o mesmo padrão das comunidades de β -Proteobacteria. Diferentemente, as comunidades de *Pseudomonas* apresentaram um agrupamento mais distinto, formando um único grupo contendo as amostras, não sendo influenciado pelos fatores ambientais estudados.

2.4 Discussão

O conhecimento da estrutura e composição de espécies que compõem comunidades bacterianas associadas às plantas é fundamental para o entendimento de como os processos biológicos associados às plantas podem ser influenciados por meio de fatores ambientais. A interação entre plantas e bactérias pode ocorrer de diversas maneiras, levando ao desenvolvimento de doenças ou a benefícios no desenvolvimento vegetal.

Entre os principais fatores que limitam a produção de soja, as doenças são os mais importantes e de mais difícil controle. Fungos fitopatogênicos causam danos às culturas dignos de prejuízo de milhões de dólares em todo mundo, apesar do amplo uso de pesticidas químicos. Por isso, a procura de técnicas alternativas de biocontrole sem utilizar qualquer fungicida sintético vem aumentando (COPPING; MENN, 2000). Nas

últimas décadas, muitos cientistas têm conduzido suas investigações sobre o desenvolvimento de micro-organismos antagonistas para patógenos de plantas, já que estes podem produzir substâncias químicas mais seguras que os fungicidas sintéticos (WAKAYAMA et al., 1984; EL-BANNA; WINKELMANN, 1998).

Neste contexto, as mudanças climáticas podem causar impactos em todos os estádios de desenvolvimento e nas diversas etapas do ciclo das relações patógeno-hospedeiro (GHINI; HAMADA; BETTIOL, 2008).

No presente estudo, foi demonstrado o potencial antagônico de bactérias epifíticas de soja como *Salmonella*, *Serratia*, e *Pseudomonas* frente à fitopatógenos importantes como *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*. Dados semelhantes foram descritos por Melo e Valarini (1995), onde verificaram ótima inibição de *Fusarium solani* por *Pseudomonas* sp. em testes *in vitro*, e Melo e Azevedo (2000) descrevem *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* como antagonistas a espécies de *Pythium* e *Rhizoctonia*.

Isolados de *Pseudomonas* spp. (GEORGAKOPOULOS et al., 2002) foram citados como biocontrole de *Pythium* spp. Ainda, Roberts et al. (2005) verificaram que a bactéria *Serratia marcescens* foi muito efetiva contra os patógenos *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*. Portanto, os resultados obtidos são condizentes com a literatura e indicam que os isolados avaliados apresentam potencial para aplicações de biocontrole contra os patógenos testados.

Outro fator analisado foi o efeito causado na comunidade bacteriana epifítica de dois cultivares de soja pelo aumento da radiação ultravioleta-B. Os tratamentos com distintos níveis de radiação UV-B não apresentaram influência significativa sobre a densidade populacional das bactérias epifíticas cultiváveis. Entretanto, os estádios de desenvolvimento do hospedeiro influenciaram a densidade populacional bacteriana, sugerindo que a fase fisiológica do hospedeiro esteja relacionada com a capacidade de colonização e estabelecimento de grupos bacterianos.

Em relação ao estágio de desenvolvimento do hospedeiro, a fase R1 apresentou maior densidade populacional bacteriana epifítica, podendo sugerir que durante esta fase as populações bacterianas estão bem estabelecidas e, sob condições favoráveis, o seu nível populacional pode crescer mais rapidamente.

A exclusão da radiação UV-B da filosfera (UV-B diminuído) dos dois cultivares de soja afetou o tamanho da população de bactérias cultiváveis desse habitat. A contagem de células mostrou que os números de bactérias isoladas foram superiores aos observados em um experimento anterior (JACOBS; SUNDIN, 2001), sugerindo que os filtros de plásticos podem ter afetado o microclima do dossel, em relação a um tratamento sem filtro.

Kuklinsky-Sobral (2004) observou que a densidade bacteriana isolada de soja sofre influência de fatores como cultivar, variações sazonais, tratos culturais, estágio de desenvolvimento do hospedeiro e tecido amostrado. Foi observado que os estádios fisiológicos sob diferentes condições ambientais afetaram significativamente a densidade populacional bacteriana. As fases R2 e R6 (florescimento e maturação fisiológica, respectivamente) apresentaram maior densidade populacional, tanto para a população bacteriana epifítica quanto para a endofítica, durante a safra de 200/01.

A grande incidência de radiação UV é uma das mais proeminentes características do ambiente da superfície foliar em que, presumivelmente, os epifíticos tiveram que se adaptar. Com efeito, uma característica marcante de bactérias epifíticas é que a grande maioria é pigmentada, conferindo proteção contra a radiação (LINDOW; BRANDL, 2003) o qual corrobora com os dados obtidos neste trabalho, onde a maioria das bactérias epifíticas isoladas de soja produziram pigmentos, com pequena diferenciação entre os cultivares estudados.

Outros mecanismos de proteção das bactérias epifíticas sob intensa incidência de radiação UV são colonização em sítios externos sombreados, como nos sulcos ao longo das veias e depressões na cutícula (MANSVELT; HATTINGH, 1987; MARIANO; McCARTER, 1993), o aumento de agregação das células ao longo do tempo, ou outras alterações na fisiologia celular (BEATTIE; LINDOW, 1995). Portanto, a distribuição bacteriana na superfície foliar não é uniforme e agregados de células podem ocorrer (MORRIS E MONIER, 2003). A presença desses agregados pode fornecer a capacidade das epifíticas de colonizar, modificar e sobreviver no habitat (WHIPPS et al., 2008), para isto, os micro-organismos residentes da filosfera tem a habilidade de produzir exopolissacarídeos (EPS) (MORRIS et al., 1997; GAL et al., 2003)

A presença de uma matriz de EPS pode proporcionar um nicho ecológico diferente para a maioria das células presentes em uma folha. Como exemplo, as características que facilitam a sobrevivência em resposta ao estresse ambiental, tais como a tolerância à radiação ultravioleta ou estresse hídrico (SUTHERLAND; 2001). De acordo com isso, neste trabalho foi avaliada a produção de EPS pelas bactérias epifíticas de soja, onde uma grande porcentagem (75%) possuiu a capacidade de produzir exopolissacarídeos em quatro tipos diferentes de fontes de carbono.

Ehling-Schulz (1997) propôs que além dos carotenóides produzidos por *Nostoc commune*, a produção de polissacarídeos extracelulares absorvem a radiação ultravioleta e protegem a célula contra a exposição de longa duração. Neste trabalho, devido à exposição dos isolados a diferentes incidências de radiação ultravioleta, pode estar relacionado com a indução de produção de EPS pelas linhagens isoladas do tratamento UV-B aumentado.

Foi realizado também o teste de resistência a UV-B com as bactérias epifíticas do segundo isolamento, onde podemos supor que aquelas que possuem mecanismos para proteção, como pigmentação e produção de EPS, são mais tolerantes a altos níveis de radiação e que são importantes adaptações das bactérias da filosfera (EHLING-SCHULZ, 1997). Como os dados de Sundin e Jacobs (1999), onde foram observadas maiores porcentagens de isolados tolerantes a radiação ultravioleta na filosfera de folhas de amendoim que produziram pigmentos cor de rosa ou laranja.

Avaliando a comunidade bacteriana epifítica não cultivável dos genótipos de soja IAC 100 e BRS 262, analisamos que o estágio fenológico R1 (florescimento) apresentou perfil de DGGE mais heterogêneo confirmando os dados analisados pela técnica de cultivo bacteriano em meio de cultura, no qual também foi observada maior riqueza de grupos bacterianos nesta fase fisiológica do hospedeiro. Do mesmo modo como foi observado no trabalho de Kuklinsky-Sobral (2004).

De modo geral, pôde-se analisar que houve uma diferença significativa da comunidade bacteriana epifítica dos cultivares de soja de acordo com o estágio fenológico da planta, quando comparada ao aumento de irradiação recebida. Isto acontece quando observamos os grupos Bacteria e β -Proteobacteria, diferentemente do

grupo das *Pseudomonas* que possui uma característica única na composição de sua comunidade, não havendo interação com os fatores ambientais estudados.

Abordagens do perfil da comunidade não cultivável têm sido particularmente valiosas para a elucidação da interação entre genótipos e a estrutura da comunidade microbiana da filosfera (WHIPPS et al., 2008).

Vários estudos têm indicado que diferentes cultivares da mesma espécie de plantas apresentam diferentes populações microbianas na filosfera como, por exemplo, entre as cultivares de pimentão e tomate (RASCHE et al, 2006; CORREA et al., 2007) e entre as variedades de batata (SESSITSCH et al., 2002). Apesar disso, as comunidades microbianas selecionadas por diferentes genótipos podem mostrar respostas semelhantes às variáveis ambientais (WHIPPS et al., 2008).

Embora o genótipo da planta parecer ser um fator importante na determinação da estrutura das comunidades microbianas da filosfera, os mecanismos de controle dessas interações precisam ser elucidados. Análises independentes de cultivo indicaram que a tolerância à UVR é provavelmente importante na pressão de seleção para a sobrevivência e crescimento na filosfera (KADIVAR; STAPLETON, 2006; STAPLETON; SIMONS 2006), e micro-organismos epifíticos são capazes de suportar altos níveis de radiação UV sobre a superfície foliar (SUNDIN; JACOBS, 1999).

Apesar dos progressos feitos na elucidação da estrutura e distribuição das comunidades microbianas na filosfera, muito pouco se sabe sobre as consequências funcionais da comunidade ou sua composição para a adaptação em diferentes genótipos de plantas. Portanto, estes resultados destacam a necessidade de outros estudos relacionando o aumento da incidência de radiação ultravioleta B com a comunidade bacteriana epifítica de diferentes genótipos e tipos de plantas.

3 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

1. Bactérias epifíticas de soja, do cultivar “Conquista”, podem servir como agentes de biocontrole contra fitopatógenos importantes como *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*, visto que 30% dos isolados testados, tiveram alguma ação antagônica.
2. A sobrevivência à radiação ultravioleta B (4720 J m^{-2}) dos isolados com capacidade de produção de EPS e produção de pigmentos, principalmente rosa e laranja, foi superior quando comparados ao controle (*Escherichia coli*). Desta forma, pode-se corroborar que a produção de pigmentos e exopolissacarídeos são importantes mecanismos de proteção no *habitat* filosfera.
3. Os tratamentos de campo (UV solar, UV-B aumentado e UV-B diminuído) não alteraram significativamente a densidade total de bactérias cultiváveis. No entanto, houve diferença significativa nessa densidade de acordo com o estágio fenológico da soja, sendo maior na fase R1. Além disso, a porcentagem de isolados pigmentados foi superior à frequência de não pigmentados, porém não houve alteração significativa entre os tratamentos.
4. Neste estudo, a análise independente de cultivo mostrou que a diferença na estrutura das comunidades bacterianas da filosfera de soja, principalmente para os grupos Bacteria e β -Proteobacteria, está relacionada com o estágio de crescimento da planta e não sofre influência significativa dos diferentes tratamentos de campo. Já o grupo das *Pseudomonas* mostrou um baixo valor de correlação com esses atributos.

REFERÊNCIAS

ANDREW J.H.; HARRIS R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Madison, v. 38, p. 145-180, 2000.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual de isolamento de microorganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Genética, 2002. 40 p.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microorganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, 2000. cap. 3, p. 57-93.

BAILEY M.J.; LILLEY, A.K.; TIMMS-WILSON T.M.; SPENCER-PHILLIPS, P.T.N. **Microbial ecology of aerial plants surface**. Mansfield Road; Oxford: Centre for Ecology & Hidrology, 2006. 340 p.

BAUER, A.W.; ROBERTS C.E.; KIRBY, W.M. Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. **Antibiotics Annual**, Washington, v. 7, p. 574-580, 1959/1960.

BEATTIE, G.S.; LINDOW S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, Berkeley, v.33, p. 145-172, 1995.

_____. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, Berkeley, v. 89, p. 353-359, 1999.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: _____. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1991. p. 33-52.

BETTIOL, W; MORANDI, M.A.B. (Ed.) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 441 p.

BEVERIDGE, T.J.; GRAHAM, L. Surface layers of bacteria. **Microbiology Review**, Ontario, v. 55, p.685-705, 1991.

BLAKEMAN J.P.; FOKKEMA N.J., Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review Phytopathology**, Old Aberdeen, V.20, p. 167–192, 1892.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa. Ed. UFV, 2005. 969 p.

COPPING, L.G.; MENN, J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, London, v. 56, p. 651-676, 2000.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; MONTECCHIA, M.S.; SORRIA, M.A. Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. **Journal of Applied Microbiology**, Buenos Aires, v. 102, p. 781-786, 2007.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Alberta, v. 41, p. 435-464, 1987.

DALL'AGNOL, A.; LAZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H. **Desenvolvimento, mercado e rentabilidade da soja brasileira**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2010. 20 p. (Circular Técnica, 74).

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

DICKINSON, C.H.; AUSTIN, B.; GOODFELLOW, M. Quantitative and qualitative studies of phylloplane bacteria from *Lolium perenne*. **Journal of General Microbiology**, Newcastle Upon Tyne, v. 91 p. 157-166, 1975.

EHLING-SCHULZ, M.; BILGER, W.; SCHERER, S. UV-B – induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. **Journal of Bacteriology**, Germany, v. 179, n. 6, p. 1940-1945, 1997.

EL BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 69-78, 1998.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil. **Sistemas de Produção / Embrapa Soja**, Londrina, n. 12, p. 1677-8499, 2008.

ERCOLANI, G.L. *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. **Journal of General Microbiology**, Bari, v. 109 p. 245-257, 1978.

_____. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and influence of leaf age and sampling time. **Microbiology Ecology**, Bari, v. 21, p. 35-48, 1991.

GAL, M.; PRESTON, G.M.; MASSEY, R.C.; SPIERS, A.J.; RAINEY, P.B. Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 3109-3121, 2003.

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

GEORGAKOPOULOS, D.G.; FIDDAMAN, P.; LEIFERT, C; MALATHRAKIS, N.E. Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 1078-1086, 2002.

GHINI, R.; HAMADA, E. **Mudanças climáticas**: impactos sobre doenças de plantas no Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 331 p.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Climate change and plant diseases. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 98-107, 2008.

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

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

GUIMARÃES, D.P.; COSTA F.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Campinas, v. 16 (2), p. 129-132, 1999.

GUNASEKERA, T.S.; PAUL, N.D.; AYRES, P.G. Responses of phylloplane yeasts to UV-B (290-320 nm) radiation: interspecific differences in sensitivity. **Mycology Research**, Lancaster, v. 101, n. 7, p. 779-785, 1997.

HEUNGES, K.; PARKE, J.L. Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two oomycete pathogens of pea (*Pisum sativum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5192-5200, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, **Produção agrícola municipal, 2007**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1190&id_pagina=1>. Acesso: 14 set. 2010.

JACOBS, J.L.; SUNDIN, G.W. Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community. **Applied Environmental Microbiology**, Texas, v. 67 p. 5488-5496, 2001.

- JACQUES, M.A.; KINKEL, L.L.; MORRIS, C.E. Populations sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-growth endive (*Cichorium endiva* var. *latifolia*). **Applied Environmental Microbiology**, Minnesota, v. 61, p. 899-906, 1995.
- KADIVAR, H.; STAPLETON, A.E. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. **Microbial Ecology**, Chattanooga, v. 45 p. 353-361, 2003.
- KINKEL, L.L.; WILSON, M.; LINDOW, S.E. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. **Microbial Ecology**, Minnesota, v. 39, p. 1-11, 2000.
- KUHLMAN, K.R.; ALLENBACH, L.B.; BALL, C.L.; FUSCO, W.G.; LA DUC, M.T.; KUHLMAN, G.M.; ANDERSON, R.C.; STUECKER, T.; ERICKSON, I.K.; BENARDINI, J.; CRAWFORD, R.L. Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California. **Icarus**, v. 74, p. 585-595, 2005.
- KUKLINSKY-SOBRAI, J; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolations and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6 n. 12, p. 1244-1251, 2004.
- LINDOW S.E.; BRANDL M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Albany, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.
- LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.
- LUCAS, R. McMICHAEL, T.; SMITH, W.; ARMSTRONG, B. **Solar ultraviolet radiation global burden of disease from solar ultraviolet radiation**. Geneva: Public Health and the Environment, 2006. 250 p. (Environmental Burden of Disease Series, 13).
- LUTEMBERG, B.J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G.V.; Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 461-490, 2001.
- MANSVELT, E.L.; HATTINGH, M.J. Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. **Canadian Journal of Botany**, Stellenbosch, v. 65, p. 2517- 2522, 1987.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção "in vitro" para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Planta**, Passo Fundo, v. 1, p. 369-409, 1993.
- MARIANO, R.L.R.; McCARTER, S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. **Microbial Ecology**, New York, v. 26, p. 47-58, 1993.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v. 2, 388 p.

MELO, I.S.; VALARINI, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52 n. 2, p. 326-330, 1995.

MISSÃO, M.R. Soja: origem, classificação e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, Maringá, v. 3, n. 1, p. 7-15, 2006.

MOREIRA, A.N.; MOREIRA, A.S.; DIA, S.P.; VENDRUSCOLO, C.T. Comportamento reológico e composição química do biopolímero da bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 produzido por via enzimática. **Brazil Journal Food Technology**, Campinas, v. 8, p. 135-142, 2005.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Gif-sur-Yvette, v. 41, p. 429-453, 2003.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M.; JACQUES, M.A. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Montfavet, v. 63, p. 1570-1576, 1997.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16s Ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. In: BONATO, E.R. (Ed.). **Estresses em soja**. Brasília: EMBRAPA-Trigo, 2000. p. 20-44.

OLIVEIRA, G.F.; CAMPOS, R.L.C.; TEMPORAL, W.F. Efeitos da radiação ultravioleta nas atividades aéreas e terrestres. **Revista Médica da Aeronáutica do Brasil**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 19-26, 2005.

PAUL, N.D.; RASANAYAGAM, S.; MOODY, S.A.; HATCHER, P.E.; AYRES, G. The role of interactions between trophic levels in determining the effects of UV-B on terrestrial ecosystems. **Plant Ecology**, Lancashire, v. 128, p. 296-308, 1997.

PELLEGRINO, G.Q.; ASSAD, E.D.; MARIN, F.R. Mudanças climáticas globais e a agricultura no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, n. 8, p. 139-162, 2007.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

RASCHE, F.; TRONDL, R.; NAGLREITER, C.; REICHENAUER, T.G.; SESSITSCH A. Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, Seibersdorf, v.52, p. 1036-1045, 2006.

REIS V.M. **Interações entre plantas e microrganismos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 24 p.

ROBERSON, E.; FIRESTONE, M. Relationship between desiccatin and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. **Applied Environmental Microbiology**, Berkeley, v. 58, p. 1284-1291, 1992.

ROBERTS, D.P.; LOHRKE, S.M.; MEYER, S.L.F.; BUYER, J.S.; BOWERS, J.H.; JACYN BAKER, C.; WEI LI; SOUZA, J.T.; LEWIS, J.A.; CHUNG, S. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. **Crop Protection**, Beltsville, v. 24, p. 141-155, 2005.

SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1595-1603, 2002.

SALLES, J.F.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

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

SMITH, R.S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, Dijon, v. 38, p. 485-492, 1992.

STAPLETON, A.E.; SIMMONS, S.J. Plant control of phyllosphere diversity: genotype interactions with ultraviolet-B radiation. In: BAILEY, M.J.; LILLEY, A.K.; TIMMS-WILSON, P.T.N.; SPENCER-PHILIPS, P.T.N. (Ed.). **Microbial ecology of the aerial plant surface** Wallingford: CABI International, 2006. p. 223-238.

SUNDIN, G.W.; JACOBS, J.L. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Microbial Ecology**, College Station, v. 38, p. 27-38, 1999.

SUTHERLAND, I.W.; KENNEDY, L. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiology**. Edinburgh, v. 9, p. 222-227, 2001.

WAKAYAMA, S.; ISHIKAWA, F.; OISHI, K. Mycocerein, a novel antifungal peptide antibiotic produced by *Bacillus cereus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 26, p. 939-940, 1984.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Washington, v. 26, p. 379-407, 1988.

WHIPPS, J.M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G.D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, Warwick, v. 5, p. 1744-1755, 2008.

WIDMER, F.; SEIDLER, R.J.; GILLEVET, P.M.; WATRUD, L.S.; DI GIOVANNI, G.D. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2545-2553, 1998.

WILSON, M.; HIRANO, S.S.; LINDOW, S.E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, Madison, v. 65, p. 1435-1443, 1999.