

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**VIVIAN JASKIW SZILAGYI-ZECCHIN**

**MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE MILHO (*Zea mays* L.): INVESTIGAÇÃO  
DO POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS  
RADICULARES E DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS ASSOCIADOS A  
FOLHAS**

**CURITIBA**

**2012**

**VIVIAN JASKIW SZILAGYI-ZECCHIN**

**MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE MILHO (*Zea mays* L.): INVESTIGAÇÃO  
DO POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS  
RADICULARES E DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS ASSOCIADOS A  
FOLHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lygia Vitória Galli-Terasawa

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariangela Hungria

**CURITIBA**

**2012**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Szilagyi-Zecchin, Vivian Jaskiw

Microrganismos endofíticos de milho (*Zea mays L.*) : investigação do potencial promotor de crescimento de bactérias radiculares e diversidade genética de fungos associados a folhas. / Vivian Jaskiw Szilagyi-Zecchin. – Curitiba, 2012.  
109 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lygia Vitória Galli-Terasawa  
Co-orientadora: Mariangela Hungria

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Milho 2. Bacterias 3. Fungos – Genetica I. Título II. Galli-Terazawa, Lygia Vitória III. Hungria, Mariangela IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética

CDD (20. ed.) 581.15]



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

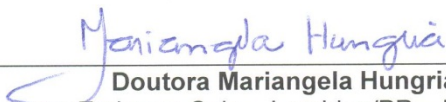



## PARECER

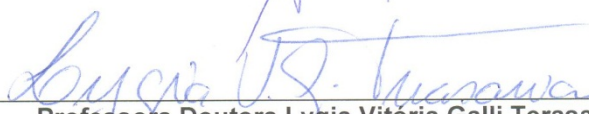
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **VIVIAN JASKIW SZILAGYI ZECCHIN**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.


Curitiba, 27 de fevereiro de 2012

  
\_\_\_\_\_  
**Doutora Mariangela Hungria da Cunha**  
Embrapa Soja – Londrina/PR – Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Vânia Aparecida Vicente**  
Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Lygia Vitória Galli Terasawa**  
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Doutora Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



**DEDICO**

Aos meus pais Luiz e Doracy...

À minha filha Maria Clara...

Ao meu marido André Luis...

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por tornar tudo possível e estar sempre presente nos momentos de dificuldades.

À minha filha Maria Clara, que em suas alegres e inocentes palavras acabava sempre me incentivando.

Aos meus pais Luiz e Maria Doracy pelo apoio e compreensão incondicional.

Ao meu marido André Luis, pela paciência, pelas palavras de carinho e incentivo e pelo imenso apoio dado durante todo o tempo.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná e aos professores do Departamento de Genética pela valiosa contribuição em minha formação.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lygia Vitória Galli Terasawa pela confiança, orientação e amizade.

À minha co-orientadora Dr<sup>ª</sup>. Mariangela Hungria pelo apoio, orientação, pela prontidão em atender e pelas palavras sempre positivas.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Kava Cordeiro e ao Prof<sup>º</sup>. Dr. Átila Francisco Mógor pelo acompanhamento e auxílio durante o transcorrer do trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Chirlei Glienke e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucimeris Ruaropelo auxílio técnico.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Marina Isabel M. de Almeida pela sua disposição em prestar assistência no tratamento estatístico dos dados.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danyelle Stringari pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

À Semília – Genética e Melhoramento, na pessoa do Dr. Francisco Terasawa Junior pelo espaço e materiais cedidos. À Vânia Portes, colaboradora da Semília, pelo

esforço dispendido na coleta dos materiais biológicos.

Às amigas Angela Cristina Ikeda, Josiele Ponzin de Oliveira, Juliana Marta Muehlmann Fischer, Lisandra Ferreira Maba e Renata Rodrigues Gomes (“Quinteto Fantástico”) pela amizade, companheirismo e auxílio no desenvolvimento do trabalho de laboratório.

Ao amigo Douglas Adamoski pelo imenso apoio técnico dispendido em todos os momentos da condução deste trabalho.

Aos amigos Luiz Fernando Jung, Rayana de Oliveira e Yuri Maluf Hokama pela amizade e incentivo.

À Jaqueline Delamuta e Renan Ribeiro pela cordialidade e apoio técnico.

Ao incansável e bem humorado Maicon André Vons Fernandes pelo auxílio em todos os experimentos de laboratório.

À todos os colegas do LABGEM pela colaboração.

Ao senhor Maurício Lefcovich pelo incentivo e compreensão dispendidos nos meses finais da conclusão da dissertação.

Sou como você me vê.  
Posso ser leve como uma brisa ou forte como uma ventania,  
Depende de quando e como você me vê passar.

Clarice Lispector



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
3.1 A CULTURA DO MILHO .....	14
3.2 A IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO .....	15
3.3 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E MICOTOXICOS .....	16
3.4 CONTROLE FUNGOS POR MEIO DE DEFENSIVOS .....	18
3.5 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS .....	19
3.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS .....	20
3.7 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS .....	22
3.7.1 Sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA .....	23
3.7.2 Sequenciamento das Regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA .....	24
4 Artigo 1 “Identificação e caracterização de bactérias endofíticas de raízes de milho ( <i>Zea mays</i> L.) para potencial uso na agricultura” .....	26
5 Artigo 2 “Diversidade genética de fungos endofíticos associados a folhas de duas linhagens de milho ( <i>Zea mays</i> L.)” .....	46
<b>6 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	70
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	72
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	73

<b>APÊNDICES</b> .....	86
1 PLACAS DE ANTAGONISMO EM FASE DE ANÁLISE.....	87
2 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICRO MORFOLÓGICA FUNGICA.....	87
3 ÁRVORES FILOGNÉTICAS DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	88
<b>ANEXOS</b> .....	90
1 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA AMOSTRAGEM DE FOLHAS .....	91
2 METODOLOGIA DETALHADA .....	91
A Preparo do material .....	91
B Meios de cultura .....	91
C Soluções e Reagentes .....	94
D Conservação dos isolados fúngicos e bacterianos.....	98
E Extração de DNA .....	99
F Amplificação das regiões ITS1-5,8S-ITS2 rDNA e gene 16S rRNA.....	101
G Purificação do produto da PCR .....	103
H Reação de sequenciamento .....	103
I Caracterização bioquímica e fisiológica da bactérias .....	104

## RESUMO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) se destaca no Brasil classificando-o como terceiro produtor mundial deste cereal. No entanto, é uma cultura exigente quanto aos tratamentos culturais, principalmente no que diz respeito à adubação, que por vezes torna seu cultivo oneroso a despeito de sua alta produtividade. A classe dos adubos nitrogenados é composta por fertilizantes químicos cuja utilização gera implicações ambientais negativas. Também as doenças tem-se tornado um grande fator de risco para o agronegócio do milho e os fungos são os seus principais responsáveis. Eles colonizam o solo e a própria semente que, se contaminadas ou ingeridas, podem levar a intoxicações graves provocadas pelas micotoxinas produzidas por algumas espécies de fungos. Tradicionalmente o controle das doenças é feito por meio de defensivos agrícolas, que também podem agredir o meio ambiente e elevar os custos da produção. Na busca por alternativas sustentáveis e mais rentáveis, o presente estudo teve por objetivos: bioprospectar bactérias endofíticas radiculares que reúnam características para promoção de crescimento vegetal de ação direta e/ou indireta, bem como investigar a presença de espécies fitopatogênicas e micotóxicas de fungos associados a folhas de duas diferentes linhagens de milho. Seis isolados do gênero *Bacillus* e um de *Enterobacter* foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Deste total, dois demonstraram promover o crescimento vegetal (*Enterobacter* -LGMB184 e *Bacillus* - LGMB186) por meio de indicadores de fixação de nitrogênio, produção de sideróforos e aumento do volume radicular de plântulas. Já os isolados de *Bacillus* LGMB128 e LGMB163 inibiram fortemente os fungos *F. verticillioides*, *C. zea-madys* e *C. graminicola*, por ação antagônica direta. Estudos posteriores são necessários para avaliar o potencial biotecnológico destes isolados a campo, visando apresentar fontes alternativas para esta cultura. Constatou-se ainda, por filogenia molecular da região ITS1-5,8S-ITS2 e caracterização morfológica, fungos de espécies saprófitas, fitopatogênicos e micotóxicos colonizando diferencialmente folhas dos dois genótipos de milho. Este levantamento demonstrou a necessidade de mais estudos da microflora associada a culturas de impacto econômico para entender a dinâmica dos riscos potenciais de manifestação de doenças associados ao saprofitismo.

**Palavras-chave:** Filogenia molecular, ITS, 16s, antagonismo, *Bacillus*, *Enterobacter*

## ABSTRACT

Maize is one of the most important crops in Brazil, which is the third largest corn producer in the world. However, it is a crop which demands cultivation practices especially about fertilization, and its management sometimes is onerous despite high productivity. Nitrogenous fertilizers belong to chemical fertilizer category whose utilization generates negative environmental implications. Also, diseases have become a risk factor for corn agribusiness and fungi are responsible for most of these diseases. They colonize soil and seed, which contaminated or ingested, can lead to serious poisoning caused by mycotoxins produced by some fungi species. Traditionally, corn disease control is done by pesticides, which can also be harmful to environment and raise production costs. Searching for sustainable and profitable alternatives, the objectives of this study were: bioprospect root endophytic bacteria which have plant growth promotion characteristics by direct and/or indirect action, as well as investigate phytopathogens species and fungi mycotoxins associated with leaves from two different maize lineages. Six isolates from *Bacillus* and *Enterobacter* genus were identified by partial 16S rDNA gene sequencing. Two of them indicated plant growth promotion (*Enterobacter* - LGMB184 and *Bacillus* - LGMB186) by *in vitro* nitrogen fixation test, siderophore production and root volume plant increase. *Bacillus* isolates LGMB128, LGMB135 and LGMB163 strongly inhibited *F.verticillioides*, *C. zea-madys* and *C. graminicola* fungi by direct antagonistic action. Further studies are request to evaluate biotechnological potential of these isolates in field, aiming to provide alternatives for maize crop. It was also found by molecular phylogeny of the ITS1-5,8S-ITS2 and morphological characterization, saprophytic, phytopathogens and mycotoxinic fungi species colonizing different leaves from two maize genotypes studied. This study demonstrated that is needed further researches concerning microflora associated with crops of economic impact to better understand potential risks of diseases associated with saprophytes expression.

Keywords: Molecular Phylogeny, ITS, 16S, antagonism, *Bacillus*, *Enterobacter*

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior produção de grãos no mundo. Sua posição de destaque se deve ao uso como fonte de energia na alimentação humana e animal (FAO, 2009). Na agricultura brasileira é economicamente expressiva, por ser uma *commodity* em ascensão no mercado internacional e possuir extensa cadeia produtiva, sendo peça fundamental na composição do sistema de rotação de culturas (BONO *et al.*, 2008).

A previsão de área cultivada total na safra brasileira de 2011/2012 deverá ficar em torno de 14.200 mil hectares. Entretanto a produtividade terá um decréscimo de 2,4% em relação à safra anterior. Neste cenário o Estado do Paraná, como seu maior produtor tem projeções de produção de 12.700 a 13.200 mil toneladas (CONAB, 2012)

O melhoramento genético das cultivares levou ao aumento de seu potencial produtivo, tornando-as mais exigentes, principalmente no que diz respeito à quantidade de nitrogênio aplicado à cultura (MATSON *et al.*, 1998). Grande parte do N fornecido às plantações de milho é proveniente de adubos sintéticos e seu uso indiscriminado resulta em poluição ambiental. (HUNGRIA *et al.*, 2007).

Outro aspecto que mudou em virtude da evolução do sistema de produção, foi o aparecimento das doenças. A partir do final de década de 90, tornaram-se um grande fator de risco para os envolvidos no agronegócio do milho. As perdas na produtividade devido ao ataque de patógenos têm sido frequentes nas principais regiões produtoras do país (COSTA *et al.*, 2010). Além disso, inúmeros fungos que colonizam as sementes produzem micotoxinas que, se ingeridas, podem levar a intoxicações graves de animais e complicações à saúde humana (HARRISON *et al.*, 1990; KELLERMAN *et al.*, 1990; PINTO *et al.*, 2007b).

A maioria dos patógenos é controlada por meio do uso de defensivos agrícolas, cuja utilização indiscriminada também leva a uma série de repercussões, como a contaminação do ambiente, alimentos, consumidores, além do aparecimento de populações de patógenos resistentes e a diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos (SILVA *et al.*, 2004).

Como alternativa ao uso de agroquímicos, as bactérias promotoras de crescimento tem se mostrado uma ferramenta promissora e viável (MELO; VALARINI, 1995; BEVIVINO *et al.*, 2000). Estes agentes são principalmente bactérias, capazes de habitar o interior das plantas sem causar, aparentemente, danos aos seus hospedeiros, são os chamados microrganismos

endofíticos (HALLMANN *et al.*, 1997 *apud* SHIOMI, 2007).

Essas bactérias podem promover o crescimento vegetal de maneira direta ou indireta. Atuam diretamente por meio da fixação biológica de nitrogênio (ASHRAF *et al.*, 2011), pois são capazes de assimilar o N<sub>2</sub> atmosférico e convertê-lo à forma assimilável (NH<sub>3</sub>), processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN). Ainda podem solubilizar fosfato (RODRIGUEZ *et al.* 2004) e produzir fitormônios como auxinas, giberelinas e zeatinas (Cassán *et al.* 2009). Sua ação indireta ocorre por meio do controle biológico de patógenos (WANG *et al.* 2009), sendo por competição de espaço e nutrientes ou atuando na indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN VEES *et al.*, 1999). Podem ainda, ser fonte de novos compostos químicos e biológicos, com propriedades antimicrobianas e de ampla utilização industrial (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

A característica fundamental dos microrganismos endofíticos, é o fato de se desenvolverem no interior dos tecidos do hospedeiro. Isso representa uma vantagem em relação ao controle biológico clássico, pois potencializa os seus efeitos sobre a planta hospedeira. Também reduz as consequências das variações populacionais, decorrentes da interação com o meio, que podem inviabilizar a formulação de um produto comercial (SHARMA; NOWAK, 1998).

Os objetivos deste trabalho fundamentam-se na importância que a cultura do milho representa para o Brasil. Desta maneira, estudos que busquem alternativas para desonerar custos e perdas na produção, por meio da diminuição do uso de fertilizantes químicos, fungicidas e a redução da incidência de micotoxinas, vem colaborar para um sistema agrícola mais sustentável e rentável. Portanto, as prospecções de bactérias que reúnam estes potenciais são importantes ferramentas para o desenvolvimento, de estratégias de manejo da cultura e futuras formulações de produtos.

A hipótese formulada para esse trabalho é de que bactérias endofíticas radiculares apresentem atividade promotora de crescimento vegetal em milho, seja por ação direta ou indireta. E para o isolamento de fungos foliares de que a diversidade genética encontrada seja semelhante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Estabelecer uma coleção de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays*L.) que reúnam características para promoção de crescimento vegetal e inibição contra espécies fúngicas fitopatogênicas.
- Investigar a presença de espécies fitopatogênicas e micotóxicas de fungos associados a folhas de duas linhagens de milho.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os isolados bacterianos molecularmente por sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA;
- Caracterizar bioquimicamente estes isolados por meio de testes que indiquem propriedades associadas à promoção de crescimento vegetal e inibição de fungos fitopatogênicos;
- Isolar fungos associados a folhas de linhagens de milho a fim de investigar a presença de espécies fitopatogênicas e micotóxicas;
- Identificar estes fungos por meio de análises moleculares, usando sequenciamento da região ITS1-5.8s-ITS2 do gene que codifica o rDNA e marcadores morfológicos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Gramineae, originária das Américas, possivelmente do México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos é o cereal que mais se destacou como cultura de importância econômica em nível mundial durante todo o século 20 e início do século 21 (BOBATO, 2006). Possui inúmeras utilizações, principalmente como base para ração animal, matéria-prima para a produção de alimentos processados e recentemente, para produção de etanol (HERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

A produção do milho no Brasil é dividida em duas épocas de plantio, sendo que os plantios de verão caracterizam a primeira safra, ocorrendo em período chuvoso e a segunda safra, chamada de “safrinha”, que é plantada quase sempre após a soja precoce (DUARTE *apud* CRUZ, 2007).

Segundo dados da Embrapa Milho e Sorgo, na safrinha o rendimento e o nível tecnológico dependem da época de plantio: nos plantios precoces o sistema de produção é praticamente igual ao utilizado na primeira safra. Nos plantios tardios o agricultor reduz o nível tecnológico em função do maior risco da cultura devido principalmente, às condições climáticas. A redução desse nível está relacionada basicamente à variedade utilizada e à redução nas quantidades de adubos e defensivos aplicados (PINTO *et al.*, 2007a).

No Brasil a produção da cultura do milho vem apresentando aumentos expressivos, decorrentes de fatores como: evolução do sistema de cultivo, disponibilidade de genótipos mais produtivos e adaptados às diversas regiões, mecanização e aumento da área de plantio resultante da área de plantio na safrinha e do avanço da cultura para novas regiões do Centro-Oeste e do Nordeste (CONAB, 2009).

A previsão para o total da área cultivada com milho, na safra 2011/2012, deverá ficar entre 14.184,3 e 14.476,7 mil hectares, alcançando aproximadamente 500 mil ha a mais que a área da safra passada (13.838,7 mil ha). A produtividade estimada é de 4.058 kg/ha, com decréscimo de 2,4% em relação à safra anterior. E a produção brasileira esperada deverá situar-se entre 57.327,0 e 58.989,3 mil toneladas, com variação de (-3) e 2,6% em relação à safra passada, quando foram colhidas 57.514,1 mil toneladas. Neste cenário o Paraná é o Estado de maior expressão Nacional, com projeções de produção de 12.721,7 a 13.194,5 mil



toneladas (CONAB, 2012).

### 3.2 A IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO

Na cultura do milho o nutriente mais exigido é o nitrogênio (N) (MALAVOLTA *et al.*, 1997). O uso de adubos químicos otimiza o potencial produtivo, uma vez que a maioria dos solos brasileiros apresenta baixa fertilidade natural (CANTARELLA; DUARTE, 2004). A quantidade de N aplicado à cultura do milho tem aumentado principalmente devido ao melhoramento genético das cultivares que por seu potencial produtivo tornaram-se mais exigentes (MATSON *et al.*, 1998). Além disso, este elemento tem baixo índice de aproveitamento pelas plantas, raramente ultrapassando 50% (HUNGRIA *et al.*, 2007). Mas quando em déficit na planta, esse nutriente se torna o principal fator limitante do crescimento vegetal, logo reduzindo a produtividade (DURÃES *et al.*, 2004).

Grande parte do N fornecido às plantações de milho é proveniente de adubos sintéticos e seu uso indiscriminado resulta em poluição ambiental. Sendo dissipado por lixiviação e escoando pelo solo, que resultará em acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis de água subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem (HUNGRIA *et al.*, 2007).

Presente na atmosfera em aproximadamente 78% da constituição gasosa é encontrado na forma molecular ( $N_2$ ), a qual não é absorvível uma vez que a maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de íon nitrato ( $NO_3$ ) e amônio ( $NH_4$ ) (SOUZA; FERNANDES, 2006). No entanto, alguns organismos procariotos são capazes de assimilar o  $N_2$  atmosférico e convertê-lo a forma assimilável ( $NH_3$ ). Este processo é denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN) (REIS *et al.*, 2006).

A FBN ocorre por ação do sistema enzimático da nitrogenase ou dinitrogenase, o que do ponto de vista energético, é dispendioso para o organismo que a realiza (REIS *et al.*, 2006). Este complexo é formado por dois componentes. O componente I é conhecido como redutase da dinitrogenase (proteína Ferro), formado por um dímero de subunidades idênticas ( $\gamma_2$ ). Estas subunidades são codificadas pelo gene *nifH*. O componente II (proteína Mo-Fe) é um tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$ , que possui dois átomos de molibdênio, 30 de ferro e 30 de enxofre. As subunidades  $\alpha$  são codificadas pelo gene *nifD* e a  $\beta$  pelo gene *nifK* (EADY, 1991).

O gene da ferro-proteína, *nifH*, é um dos mais antigos e funcionais da história da evolução. As relações entre bactérias baseadas nesse gene têm estado em concordância com

a filogenia inferida pelo gene do rRNA 16S. Isso tem possibilitado estudos de diversidade dos genes de FBN e a caracterização destes genes em comunidades microbianas (ROSADO *et al.*, 1998). A amplificação do *nifH* pode informar quais tipos de microrganismos estão envolvidos na FBN (ZANG; SUN, 2010) e confirmar a presença do gene em um organismo que se espera ser fixador (BENEDUZZI, 2008).

### 3.3 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E MICOTÓXICOS

A cultura do milho está sujeita à ocorrência de várias doenças, que podem afetar a produção, qualidade, palatabilidade e o valor nutritivo dos grãos e da forragem (SASSE, 2008). Sob condições favoráveis, diferentes doenças podem ocorrer em alta severidade, pois existem fatores predisponentes na planta e no patógeno, além da influência de condições ambientais, sistema de cultivo e manejo da cultura. A incidência e a severidade dessas doenças decorrem da realização de plantios de milho na palhada, sem a rotação de culturas e, nas regiões de clima quente, pela sobreposição de ciclos da cultura (PINTO *et al.*, 2007a).

Na Região Sul do Brasil, as doenças mais frequentes estão relacionadas à germinação de sementes, podridões do colmo e da espiga e doenças foliares causadas por fungos (CASA *et al.*, 2010). Durante a germinação, a semente de milho pode ser atacada por fungos presentes no solo ou na própria semente levando ao seu apodrecimento ou a morte da plântula, que resulta numa emergência desuniforme e baixa população de plantas emersas. Os danos nesta fase da cultura refletem uma redução de plantas por unidade de área. Como consequência do ataque dos fungos de solo e/ou dos presentes na semente, as plântulas infectadas e sobreviventes, à medida que prosseguem seu desenvolvimento, podem apresentar sintomas no sistema radicular, que às vezes passam despercebidos. Porém, os sintomas primários evoluem lentamente à medida que a planta se desenvolve (REIS *et al.*, 2004)

As principais manchas foliares são a helmintosporiose comum, causada pelo fungo *Exerohilum turcicum* [(Pass.) Leonar & Suggs], a mancha branca da folha ou feosféria, causada por *Phaeosphaeria maydis* [(P. Henn.) Rae, Payak & Renfro] e a mancha de diplodia, causada por *Stenocarpella macrospora* (REIS *et al.*, 2004). Atualmente, merece destaque a cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora zae-maydis* [Tenhon & Daniels] (VIÉGAS, 1945 *apud* CASA *et al.*, 2010).

As podridões do colmo são frequentes e geram grandes problemas para a produção do

milho (FERNANDES; BALMER, 1990). Este tipo de doença consiste no apodrecimento dos tecidos do colmo, que se tornam evidentes quando as plantas estão próximas da colheita e promovem a paralisação do processo normal de enchimento de grãos, acamamento e a morte prematura da planta. No Brasil, os fungos *Colletotrichum graminicola* [(Ces) G.W. Wils.], *Stenocarpella maydis* [(Berk.) Sutton, Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.], *S. macrospora* [(Earle) Sutton Sin. *D. macrospora* Earle in Bull.], *Fusarium graminearum* [Schwabe (*Gibberella zae* Schw.)] e *Fusarium verticillioides* [Sin.= *Fusarium moniliforme* [J. Sheld (*Gibberella fujikuroi* Sawada)], são citados como principais agentes causais deste tipo de moléstia (REIS *et al.*, 2004).

Os grãos infectados por fungos podem exibir descoloração, denominados de grãos ardidos, sintoma que ocasiona a desvalorização das espigas no momento da comercialização (CASA *et al.*, 2010). Os grãos ardidos em milho são o reflexo das podridões de espigas, causadas principalmente pelos fungos presentes no campo: *Diplodia maydis* (*Stenocarpella maydis*), *D. macrospora* (*Stenocarpella macrospora*), *Fusarium moniliforme*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* e *Gibberella zae*. Ocasionalmente, no campo, há produção de grãos ardidos pelos fungos *Penicillium oxalicum* e *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (PINTO, 2006).

Existe uma gama de micotoxinas produzidas, algumas são mais importantes vistas suas toxicidade e o tipo de produto que origina a fonte de contaminação como, por exemplo: fumonisinas (milho e sorgo); deoxinivalenol e nivalenol (trigo, milho, cevada, arroz, soja e centeio); Ocratoxina A (café, trigo, cevada, vinho, arroz e aveia); zearalenona (milho, trigo, aveia, cevada, arroz, soja, caroço de algodão e centeio); aflatoxina (milho, amendoim, castanha do Brasil, feijão, arroz, pistache, castanha de cajú, figo seco, caroço de algodão, soja, sorgo e girassol) (FAO, 2001).

Fungos do gênero *Fusarium* spp. produzem as micotoxinas de maior impacto econômico mundial (SMITH; SEDON, 1998). As fusariotoxinas são bastante diversas em suas estruturas químicas e características patológicas. Dentre estas toxinas são incluídas: fumonisinas, zearalenona, moniliformina, ácido fusárico e os tricothecenos (ARAÚJO; TAKISHITA, 2007).

Várias técnicas de combate a estes metabólitos indesejáveis são estudadas: Huwig *et al.* (2001) descreveram a utilização de carvão ativado como adsorventes para micotoxinas, entretanto, este se demonstrou inespecífico para estas toxinas, adsorvendo também nutrientes minerais da dieta; Murphy *et al.* (2006) relataram o fracasso de processos de tostagem na remoção de ochratoxinas e técnicas de processamento parecem não diminuir o efeito da

vomitoxina e fumonisinas em rações; Yumbe-Guevara, *et al.* (2003) encontraram o mesmo na avaliação da termoestabilidade de vomitoxinas e zearalenonas.

A contaminação de alimentos e rações por micotoxinas representa um sério problema de saúde para humanos e animais, além de constituir um considerável obstáculo à economia de países da África, Ásia e da América Latina, nos quais a balança comercial se baseia para exportações de *commodities*. Em virtude da presença de micotoxinas, milhões de dólares são perdidos anualmente (FREIRE *et al.*, 2007).

### 3.4 CONTROLE DE FUNGOS POR MEIO DE DEFENSIVOS

Para o controle das doenças, podem ser adotadas medidas de manejo da cultura, além do uso de cultivares resistentes e medidas de controle químico (PINTO *et al.*, 2007a). Entretanto, a partir do ano 2000, grande ênfase tem sido dada ao controle de doenças através da aplicação de fungicidas. Antes, o uso destes produtos era restrito a campos de produção de sementes e de milhos especiais, como milho pipoca e milho doce. Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento acentuado da utilização de fungicidas em lavouras comerciais destinadas à produção de grãos (COSTA; COTA, 2009). Mas doenças da espiga e podridões das raízes e do colmo dificilmente são controladas com fungicidas, devido ao custo elevado do produto e limitações para pulverização eficiente de maneira a atingir essas partes da planta (PINTO *et al.*, 2007a).

Mesmo que o controle químico não seja eficiente para algumas doenças, hoje em dia ele é usado em larga escala e, num futuro próximo, com o aumento da população mundial, a demanda por alimentos crescerá de forma significativa. Isto fará com que uma elevada quantidade de agrotóxicos seja lançada no meio ambiente, acarretando sérios problemas, que poderiam ser evitados com a utilização do controle biológico (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

Em 2010, de acordo com dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), as quantidades totais vendidas de defensivos agrícolas no Brasil mostraram-se superiores se comparadas às do ano anterior. Verificou-se que foi comercializada a quantidade recorde de 790.790 t (acréscimo de 9,0% em relação a 2009), correspondendo a 342.593 t de princípio ativo (incremento de 2,0%, no período). A classe de defensivos que apresentou melhor desempenho comercial foi a dos fungicidas, cujas vendas em 2010 aumentaram 52,4% em relação a 2009 (FERREIRA *et al.*, 2011).

Das culturas que mais utilizam defensivos no Brasil, tendo como referência o ano de

2010, a soja é a principal, com 44% do valor total das vendas e em quarto lugar vem o milho com 14,6% vendas. Visualizando apenas o uso de fungicidas, tem-se 136.972 t de produto comercial e 55.583 t de ingredientes ativos consumidos só no ano de 2010, estando o milho safrinha, entre as sete maiores culturas consumidoras de fungicidas (soja, café, batata-inglesa, citros, feijão, algodão e milho safrinha) (FERREIRA *et al.*, 2011).

Segundo Romeiro (1999) é necessário investigar métodos alternativos para o controle de enfermidades de plantas que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde humana e ao equilíbrio de ecossistemas.

A agricultura ecológica é considerada o ramo da agropecuária mais promissora, com um crescimento de cerca de 10% ao ano. O sistema de cultivo e os processos de controle biológico de pragas empregados nessa atividade têm características próprias (MEDEIROS *et al.*, 2008). O biocontrole pode ser feito de diversas maneiras: alterando as condições ambientais que possibilitam o aparecimento da praga ou doença; utilizando microrganismos com propriedades antagônicas aos patógenos ou parasitando as pragas (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

### 3.5 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Microrganismos que são capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal foram denominados de endofíticos pela primeira vez por De Bary em 1866 (STONE, 1988). Petrini (1991) propôs que a definição fosse expandida caracterizar mais precisamente os organismos que colonizam os tecidos internos dos vegetais, sem causar dano aparente.

Algumas bactérias, que vivem associadas a plantas, têm a habilidade de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta (COMPANT *et al.*, 2010). Atuam diretamente através da fixação biológica de nitrogênio (ASHRAF *et al.*, 2011); solubilização de fosfato (RODRIGUEZ *et al.*, 2004) e produção de fitormônios como auxinas, giberelinas e zeatinas (CASSÁN *et al.*, 2009). Na ação indireta agem por meio do controle biológico de patógenos (WANG *et al.*, 2009) e representam fonte de novos compostos químicos e biológicos, com propriedades antimicrobianas e de ampla utilização industrial (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

Uma vez dentro dos tecidos da planta é possível, segundo Dong *et al.* (1994), transmitir vegetativamente os microrganismos endofíticos, como foi demonstrado para *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar, por até duas gerações. Quando inoculadas nas sementes, promoveram o crescimento e aumentaram a produtividade de feijão (FÜRNKRANZ *et al.*, 2009);

no milho e soja, além do efeito promotor de crescimento, aumentaram a germinação (CASSÁN *et al.*, 2009).

No controle biológico, os microrganismos endofíticos têm a vantagem de habitar um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, direcionando o controle por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002). Atividade inibitória *in vitro* e/ou *in vivo* contra fitopatógenos podem ser listadas: controle de *Exserohilum turcicum* causador de mancha foliar (SHIOMI, 2007); ação fungistática direta de isolados de *Bacillus* spp. sobre fungos *R. solani* e *F. oxysporum* (EKUNDAYO *et al.*, 2011) e a inibição de *Fusarium* e *Curvularia* por indivíduos da família Bacillaceae (RÁTÓN *et al.*, 2011).

Estes microrganismos vêm despertando atenção em todo o mundo, devido à necessidade de reduzir o uso de produtos químicos, visando um sistema de agricultura sustentável, centrada na proteção ambiental (VALE *et al.*, 2010). No Brasil, inoculantes comerciais para milho à base de cepas de *Azospirillum brasiliensis* já foram formuladas e elevaram a produção de grãos em 24-30%, em relação aos controles não inoculados (HUNGRIA *et al.*, 2010). Dos produtos para controle biológico à base de microrganismos, a maioria é constituída por bactérias (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). Os agentes microbianos surgiram como uma alternativa viável e efetiva dentro do biocontrole, além de serem considerados mais seguros à saúde humana e ao ambiente (ZUCCHI; MELO, 2009).

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS

Para a seleção de isolados que apresentem maior probabilidade de eficiência no processo de colonização, promoção de crescimento e controle biológico *in vivo*, têm-se como aliadas as análises bioquímicas preliminares *in vitro* e os testes de antagonismo (PAL *et al.* 2001; BERNARDES *et al.* 2010; DEEPA *et al.*, 2010; RANA *et al.*, 2011).

O ácido indol acético (AIA) é a principal auxina de ocorrência natural nas plantas (HARTMANN *et al.*, 2002). Necessário para iniciar a divisão celular no periciclo das raízes, para promover a divisão celular e para a manutenção da viabilidade das células durante o desenvolvimento das raízes laterais (TAIZ; ZEIGER 2004). No entanto, inúmeras bactérias também são capazes de sintetizá-lo e promover crescimento em plantas, tais como: *Azospirillum brasilienses*, *A. lipoferum* (KUSS *et al.*, 2007) espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* (BENEDUZI *et al.*, 2008; RATÓN *et al.*, 2011); *Providencia* (RANA *et al.*, 2011) e

*Pseudomonas fluorescens* (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008).

O fósforo é quantitativamente o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal (KUCEY, 1988). Mas, devido a sua reatividade, a quantidade total de P no solo pode ser alta, mas indisponível para a captação pelas plantas (LÓPEZ-BUCIO *et al.*, 2002). Uma solução pode ser a utilização de processos microbiológicos para aproveitar o fosfato de rochas (ZAPATA ; AMANN, 1995). Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfato inorgânico (SONG *et al.*, 2008; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010).

Existem compostos que atuam diretamente na promoção de crescimento e indiretamente no controle biológico. Esta capacidade se deve ao fato de sequestrarem a maioria do  $Fe^{3+}$  disponível. Desta forma, facilitam o crescimento vegetal e previnem a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico por competição (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Nesta categoria são enquadrados os sideróforos, que são secretados por microrganismos em resposta à baixa disponibilidade de  $Fe^{3+}$  em solução. Muitos sideróforos podem formar também complexos relativamente estáveis com cobre, alumínio, molibdênio e alguns outros elementos (BENITE *et al.*, 2002). Esses compostos atuam do lado externo da membrana celular, capturando moléculas de ferro em solução e ligando-se especificamente a receptores do complexo localizados na membrana, por onde são absorvidos, tornando assim, o ferro disponível para o crescimento vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os fitopatógenos fúngicos precisam de sítios de entrada para obterem acesso ao interior do hospedeiro. Portanto, os microrganismos de controle biológico precisam reunir características de forma a conseguir competir efetivamente por estes sítios de infecção, utilizando os nutrientes disponíveis e conseguindo inibir de forma eficaz a germinação de propágulos ou o crescimento vegetativo (PUNJA; UTKHRDE, 2003).

Diversos estudos têm investigado em bactérias a possibilidade da ocorrência de mecanismos de penetração ativa. Esta hipótese foi sustentada pela detecção de enzimas celulolíticas e pectinolíticas produzidas por algumas espécies, como *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter asburie* e *Bacillus* sp. (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997; RATÓN *et al.*, 2011).

A parede celular é uma barreira que confere proteção às ações exercidas pelos microrganismos, sendo considerada o ponto inicial das interações no processo de antagonismo envolvendo fungos. Os fungos têm parede celular constituída principalmente por quitina e  $\beta$ -1,6-glucanas entre outros polissacarídeos (BARTINICK-GARCIA, 1968). Fisicamente, a quitina

parece estar protegida pelas  $\beta$ -glucanas, o que dificulta o acesso das quitinases (CHÉRIF; BENHAMOU, 1990), por isso estas enzimas extracelulares têm sido consideradas como as principais hidrolases envolvidas em processos de parasitismo (MARTIN *et al.*, 2007; ZEILINGER; OMANN, 2007).

Quando as quitinases degradam a parede celular de fungos, acabam liberando oligômeros que induzem a expressão de outros genes de enzimas hidrolíticas e com isso, acentuam o ataque ao hospedeiro (VITERBO, *et al.*, 2002). As  $\beta$ -glucanas constituem um grupo de polissacarídeos abundante na natureza e sua principal função é ser um polímero estrutural, podendo também ser degradadas para serem utilizadas como fonte nutricional. Podem ainda proteger as células contra desidratação, pois forma uma mucilagem que encapsula a hifa (PITSON; *et al.*, 1993; MARTIN *et al.*, 2007)

As proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas, podendo ser classificadas quanto às condições hidrogeniônicas ideais para sua ação (ácidas, neutras e alcalinas); quanto à especificidade ao substrato (colagenase, elastase, etc) ou quanto à similaridade (pepsina, tripsinas, caseínas, etc) (KUBICEK, 1992), que no biocontrole funcionam degradando a parede celular do hospedeiro (MARTIM *et al.*, 2007).

A produção de ácido hidrocianâmico (HCN) pelas RPCPs parece ser um fenômeno bastante comum. Este metabólito, derivado da glicina, além de apresentar propriedades inibidoras de patógenos, também pode promover diretamente o crescimento das plantas pelo aumento dos pêlos radiculares (LUZ, 1996). Deepa *et al.* (2010) constatou espécies de *Bacillus thioparas* produtores de HCN. Isolados de *Pseudomonas putida* promoveram a acumulação de fenólicos e fitoalexinas em cotilédones de *Phaseolus vulgaris* por ação de HCN (ZDOR; ANDERSON, 1991).

A antibiose é o fenômeno mais comum, pelo qual um microrganismo inibe o crescimento de outro pela produção de compostos tóxicos (COOK; BAKER, 1989). Este método é bastante empregado para avaliar as potencialidades da ação de bactérias, principalmente sobre fungos fitopatogênicos (BARRA *et al.*, 2008; BARRETO *et al.*, 2008; KÜNRKRANZ *et al.* 2009; RANA *et al.*, 2010).

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A correta identificação dos microrganismos é de fundamental importância para estabelecer medidas de controle, prevenir a disseminação de patógenos ou referenciar cepa de



interesse biotecnológico. Para tanto, a utilização de técnicas rápidas e sensíveis que forneçam resultados confiáveis na identificação correta dos microrganismos são essenciais. Neste sentido, é necessário procurar pela otimização de protocolos e diversifiquem os métodos de pesquisa (ATKINS; CLARK, 2004).

Os métodos fenotípicos clássicos utilizados para identificação de bactérias são importantes, tais como morfologia, testes bioquímicos e sorológicos, perfil de ácidos graxos e exopolissacarídeos e padrões enzimáticos. Porém, apresentam limitações que os tornam insuficientes para a discriminação acurada de espécies e estirpes (OLIVEIRA *et al.* 1999). Os fungos também vinham sendo identificados principalmente por meio de características morfológicas e bioquímicas, as quais nem sempre refletem sua real diversidade (FEGAN *et al.*, 1993). Contudo, quando estes os métodos taxonômicos clássicos estão associados às técnicas de biologia molecular, tornam-se, em conjunto, poderosas ferramentas para a caracterização e a identificação do germoplasma microbiano (GÜTLER; STANISICH 1996; OLIVEIRA *et al.* 1999).

Estudos conduzidos por Woese e Fox (1977) indicaram a utilização do RNA ribossomal (RNAr), mais especificamente da subunidade menor do ribossomo (16S para procariotos e 18S para eucariotos), como marcador filogenético universal. A sequência do RNAr está presente em todos os organismos e evolui em uma taxa relativamente baixa, permitindo a detecção de parentesco entre as espécies muito distantes, sofrendo pouca ou nenhuma transferência horizontal (HARRIS *et al.*, 2003).

Ao contrário das sequências codificantes do rDNA, as regiões espaçadoras internas (ITS) evoluem rapidamente apresentando alto polimorfismo, tornando-se de grande interesse para estudos filogenéticos com relação a gêneros, espécies e populações (WHITE JUNIOR; MORROW, 1990).

A filogenia, definida como o estudo das relações taxonômicas, é amplamente utilizada para determinar a relação existente entre os organismos, indicar seu possível grupo, suas relações com outros grupos e seu lugar nas famílias e reinos. A filogenia pode, também, ajudar a reconhecer ancestrais (WANG; MARTÍNEZ-ROMERO, 2000).

### 3.7.1 Sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana possibilitando investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas

domeio ambiente (KUSKE *et al.* 1997; HENTSCHEL, *et al.*,2002; BARRETO *et al.*, 2008) e associadas a plantas (RIJAVEC *et al.*, 2007; FÜRNKRANZ *et al.*, 2009)

Uma espécie bacteriana pode ser definida como um grupo de estirpes/isolados genomicamente semelhante, que compartilham um elevado grau de similaridade em várias características independentes (ROSSELLÓ-MORA; AMANN, 2001). O grau de similaridade de procariotos para se considerar uma espécie, deve ser maior que 97% na sequência do gene ribossomal 16S comparada à estirpe tipo, o que permite aos microbiologistas identificarem rapidamente novas espécies (VANDAMME *et al.*, 1996; GEVERS *et al.*, 2005)

Pereira *et al.* (2011) investigaram a diversidade de bactérias associadas com as raízes de milho através do uso de sequenciamento parcial do gene 16S e (ITS) de 16S-23S. Kuske *et al.* (1997), construíram bibliotecas metagenômicas e sequenciaram parcialmente o gene 16S rRNA e, verificaram extensa diversidade nas comunidades bacterianas. Nesse trabalho foi observado, com relação à identificação dos microrganismos presentes no solo, que o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA com aproximadamente 700 pb, apresenta resultados semelhantes aos encontrados no sequenciamento total do gene. Ratón *et al.* (2011) identificou espécies formadoras de endósporos em nível de gênero utilizando a região hipervariável 5' (nucleotídeos 70-485) do 16S, assim como Reva *et al.*, (2004) e Ouattara *et al.*, (2010). Sequências parciais podem reduzir o tempo de análise e diminuir os custos do trabalho (SILVEIRA, 2004).

### 3.7.2 Sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA

As regiões mais usadas em sistemática são as que transcrevem os RNA ribossômicos (rDNA), pois estão em grande número de repetições ('tandem'), além de não sofrerem seleção, comportam-se como neutros e podendo-se estimar o tempo da divergência entre os táxons (GARDES; BRUNS, 1993). Além de tudo, o rDNA de inúmeras espécies possuem suas sequências depositas em bancos de dados, permitindo comparações (NILSSON *et al.*, 2010). No entanto, estes bancos de dados precisam ser utilizados com cuidado, pois podem conter vários tipos de erros, como de identificação e técnicos (NILSSON *et al.*, 2006).

Essas regiões rDNA são caracterizadas pela alternância de sequências transcritas (ITS - região espaçadora interna) e não transcritas (IGS – região espaçadora intergênica). A ITS possui duas regiões denominadas de ITS-1, que se encontram entre o 18S e o 5.8S; já a ITS2, está entre o 5.8S e o 25-28S. As características que marcam esta região como convenientes

para a identificação molecular são: a) toda a região ITS pode ser amplificada com oligonucleotídeos universais; b) multicópias naturais de repetição de rDNA fazem a região ITS ser fácil para amplificar e c) estudos vêm demonstrando que regiões ITS são frequentemente variáveis entre a distinção morfológica das espécies de fungos (GARDES; BRUNS, 1993).

Por suas características citadas acima a região ITS do rDNA foi proposta como o marcador de código de barras oficial (*barcoding*) primário para fungos. Podendo ser empregado para identificação de um único taxa ou para amostras ambientais ("DNA barcoding ambiental") (BELLEMAIN *et al.*, 2010).

Estudos tem confirmado a utilidade da região ITS1-5.8S-ITS2: Farr *et al.* (2002) caracterizaram por análise molecular, linhagens de *Phomopsis* sp. isolados de *Vaccinium corymbosum* e *V. macrocarpon*. Verificaram que a maioria dos isolados tratava-se de *Phomopsis vaccinii*, uma vez que as sequências agruparam-se com uma cultura referência dessa espécie. Bhagat *et al.* (2011) identificou isolados de plantas medicinais em nível de gênero e espécie, assim como Sun *et al.* (2011) o fez com fungos de folhas de uma arbórea (*Acer truncatum*). No entanto, alguns estudos acabam por classificar os isolados até gênero como Pan *et al.* (2008) trabalhando com endofíticos de milho e Bernardi-Wenzel *et al.* (2010) endofíticos foliares de planta medicinal (*Luehea dicaricata*). As regiões ITS1 ou/ e ITS2 tem proporcionado altos rendimento em estudos de sequenciamento, permitindo análises criteriosas da diversidade de fungos (BUÉE *et al.*, 2009; JUMPPONEN *et al.*, 2009).

Para alguns grupos de fungos, a região ITS não é suficiente para distinção de sua posição taxonômica, sendo necessário realizar análises multigênicas para discriminar espécies, como: o gênero *Cladosporium* (SCHUBERT *et al.*, 2009), principalmente para complexos que envolvem a espécie *C. cladosporioides* (BENSCH *et al.*, 2010); *Phomopsis* (VAN RENSBURG *et al.*, 2006; LAMPRECHT *et al.*, 2011) grupo este que está sendo redefinido; *Fusarium*, em especial os complexos *F. graminearum* *G. fujikuroi* (O'DONNELL *et al.*, 2004; O'DONNELL *et al.*, 1998) e o complexo de espécies *Alternaria alternata* (ANDREW *et al.*, 2009).

## 4ARTIGO 1

### Identificação e caracterização de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) para potencial uso na agricultura

#### Resumo

Seis bactérias endofíticas de raízes de milho foram identificadas por sequenciamento parcial do gene 16S do rRNA, como sendo *Bacillus* sp. e uma como *Enterobacter* sp. Todas foram positivas para o indicativo de fixação de nitrogênio por formação de película, entretanto apenas LGMB128, LGMB163 e LGMB184 tiveram o gene *nifH* amplificado. Dois isolados do gênero *Bacillus* (LGMB128 e LGMB135), mesmo apresentando boas respostas quanto à produção de AIA, sideróforos e enzimas líticas, não se constituíram bons candidatos para atuar como promotores de crescimento de maneira direta, pois reduziram em cerca de 20% a germinação das sementes. No entanto, os mesmos tiveram um bom desempenho antagonista contra os fitopatógenos *Colletotrichum graminicola* e *Fusarium verticillioides*, *Bipolaris maydis* e *Cercospora zea-maydis*. Como indicativo de ação bacteriana favorável, *Enterobacter* sp. LGMB184 e *Bacillus* sp. LGMB186 aumentaram o volume radicular em 43,9% e 39,02% e a germinação das sementes em 47,0% e 55,5% respectivamente, mesmo não tendo apresentado as melhores respostas nos testes bioquímicos. Seu alto efeito específico, de induzir o aumento da área de absorção radicular, faz deles candidatos potenciais a testes futuros como inoculantes biológicos para a cultura do milho.

**Palavras-chave:** Filogenia molecular, 16S rRNA, *nifH*, promoção crescimento vegetal, antagonismo.

## Abstract

Six endophytic bacteria from maize roots were identified by partial 16SrDNA gene sequencing as five *Bacillus* sp. and one *Enterobacter* sp. All of them were positive *in vitro* nitrogen fixation test, however just LGMB128, LGMB163 and LGMB184 had *nifH* gene amplified. Two isolates from *Bacillus* genus (LGMB128 and LGMB135), even showed good results at IAA, siderophores and lytic enzymes production, were not good candidates to be plant growth promoters by direct way because they reduced about 20% of seed germination. However, they had good results at antagonist test against phytopathogens fungi *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides*, *Bipolaris maydis* and *Cercospora zea-maydis*. Like an indicative of bacteria beneficial action, *Enterobacter* sp. LGMB184 and *Bacillus* sp. LGMB186 increased root volume about 43.9% and 39.02%, and germination about 47.0% and 55.5% respectively, even they did not present the best results in biochemical tests. Their high specific effect inducing increase at root absorption area make them candidates for future tests as biological inoculants for corn crop.

**Keywords:** Molecular phylogeny, 16SrRNA, *nifH*, promoting plant growth, antagonism.

## Introdução

A literatura descreve que algumas bactérias, que vivem associadas a plantas, têm a habilidade de promover o crescimento vegetal (Compant et al. 2010). Esses microrganismos vêm despertando atenção, devido à necessidade de reduzir o uso de produtos químicos, num contexto de agricultura sustentável e atenta à proteção ambiental (Vale et al. 2010). Uma das estratégias consiste em explorar os benefícios da ação dos microrganismos sobre o cultivo de plantas na forma de inoculantes (Lucy et al. 2004).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas podem atuar diretamente, através de um ou mais mecanismos, incluindo a fixação biológica de nitrogênio (Ashraf et al. 2011), solubilização de fósforo (Rodríguez et al. 2004), produção de hormônios como auxinas, giberelinas e zeatinas (Cassán et al. 2009) ou agirem indiretamente por meio do controle biológico de patógenos (Wang et al. 2009). Além disso, alguns estudos apontam para o trabalho preferencial com microrganismos residentes da planta em questão ou com isolados adaptados, devido à fácil colonização e ao menor risco de introdução de organismos exógenos (Enebak et

al. 1998; Khalid et al.2004).

Para a seleção de isolados que apresentem maior chance de serem eficientes no processo de colonização e promoção de crescimento, têm-se como aliadas as análises bioquímicas preliminares *in vitro* (Pal et al. 2001; Berg et al. 2002; Bernardes et al. 2010).

Benefícios proporcionados por bactérias à cultura do milho já foram descritos, incluindo a promoção de crescimento, devido ao aumento da disponibilização de nutrientes proporcionado pela inoculação de *B. subtilis* em sementes (Canbolat et al. 2006), cepas de *Azospirillum* aumentaram a produção de grãos de milho de 24 a 30%, em relação aos controles não inoculados (Hungria et al. 2010).

A classificação de microrganismos de importância agrícola é importante e para tanto gêneros bacterianos vem sendo identificados com sucesso utilizando o 16S rRNA, como *Bacillus* (Porwal et al. 2009; Deepa et al. 2010) *Rhizobium*, *Burkholderia* (Ferreira et al. 2011), *Enterobacter*, *Pantoea*, *Serratia* entre outros (Tian et al. 2009)

O objetivo do presente estudo visou caracterizar por análises enzimáticas, fisiológicas e genéticas bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) com uso potencial na agricultura.

## Material e métodos

### Material biológico

As sete bactérias estudadas pertencem a coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LABGEM) da Universidade Federal do Paraná. Foram isoladas por Ikeda (2010), de raízes de milho, em um ensaio de campo conduzido na Semília Genética e Melhoramento LTDA situada na região de Campo Largo-PR.

Os fungos *Cercospora zea-maydis* (LGMF1047) e *Bipolaris maydis* (LGMF1048) foram gentilmente cedidas pelo Instituto Biológico de São Paulo. O *Colletotrichum graminicola* (LGMF1044) é oriundo da coleção da Embrapa Milho e Sorgo e *Fusarium verticillioides* (LGMF1046) advém da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

### Identificação das bactérias por análise do gene 16S rRNA

#### *Extração de DNA bacteriano*

O DNA genômico foi obtido segundo protocolo de Raeder e Broda (1985), com as seguintes modificações: bactérias foram cultivadas por uma noite em 4 mL de meio líquido DYGS (Rodrigues Neto et al. 1986), sendo então centrifugadas por 2 min a 10.000 g. Adicionaram-se ao *pellet* 2 mL de tampão de extração (Tris-HCl pH 8,0 125 mMol/L; NaCl 2 Mol/L; EDTA pH 8,0 50 mMol/L e SDS pH 7,2 a 1%), previamente aquecido a 60°C. Após secagem, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de água ultrapura. A integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), corado com GelRed™ (Biotium, Estados Unidos), diluído em Tampão de Amostra para 100X, observado em transluminador de ultravioleta (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotodocumentado (Programa Digidoc it). A quantificação e pureza foram avaliadas em espectrofotômetro (por comprimento de onda) NanoDrop 2000® (Thermo Scientific).

#### *Amplificação e purificação da região codificadora do gene 16S rRNA*

A amplificação foi realizada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com os *primers* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al. 1991), com desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 15 s a 94°C, 45 s a 93°C, 45 s a 55°C, 2 min a 72°C, seguida de extensão final de 5 min a 72°C. A purificação com acetato de amônio 7,5 M foi realizado segundo Menna et al. (2006). Água ultrapura foi usada para ressuspenso o DNA. A quantidade e pureza foram avaliadas como descrito acima e em gel de agarose a 1,5% (p/v), ajustando a concentração final para 16 ng µL<sup>-1</sup>.

#### *Sequenciamento parcial e análise do gene 16S rRNA*

Para a segunda reação de PCR utilizaram-se os *primers* desenhados pelo Prof. Leonardo M. Cruz (Dep. Bioquímica, UFPR, Curitiba, PR, Brasil): 362f (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'), 786f (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') além do *primer* fD1 (Weisburg et al. 1991). Adicionaram-se 80 ng do produto da primeira reação de PCR purificado, 0,25 µM de *primer*, 2 µL da mistura para sequenciamento ET e água ultrapura para completar um volume final de 10 µL. A amplificação foi realizada por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 15 s a 50°C e 90 s a 60°C.

Após a amplificação, a purificação foi feita em placa com o gel de filtração Sephadex™ G-50 medium (GE Healthcare®) e então, o produto foi submetido à eletroforese em Sequenciador

Automático de DNA modelo MegaBACE1000 (Amersham Biosciences®).

A verificação da qualidade das bases e montagem dos fragmentos foram realizadas no programa PhredPhrap Consed (Ewing et al.1998). Os alinhamentos foram realizados no programa PRANK (Löytynoja e Goldman 2010). Os percentuais de silimaridade foram obtidos no RDP (*Ribosomal Database Project*).

As análise filogenéticas foram realizadas por Inferência Bayesiana com o software MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck 2003), usando computação paralela (Altekar 2004) com quatro cadeias. O modelo evolutivo foi escolhido através do programa JModelTest (Posada e Kandal 1998). O número de gerações e *burnin* foram definidos por múltiplas análises de sequências com avaliação da estabilidade topológica pelo pacote AWTY (Nylander et al. 2008) e a estabilidade paramétrica analisada pelo software Tracer 1.5. Com os valores adequados de *burnin*, as árvores finais foram sumarizadas com o software SumTrees do pacote DendroPy 3.8.1 (Sukumaran e Holder 2010).

#### Amplificação de gene da nitrogenase *nifH*

A PCR foi realizada com os *primersnifHF* (5'-TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA-3') e *nifHI* (5'-AGCATGTCYTCSAGYTCNTCCA-3') (Laguerre et al. 2001). Foi utilizada desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 30 ciclos de 1 min s a 94°C, 1 min a 55°C, 3 min a 72°C, seguida de extensão final de 5 min a 72°C. A constatação foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), com marcador de massa, Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) e fotodocumentação como descrito acima.

#### Caracterização enzimática e fisiológica das bactérias

##### *Fixação biológica de nitrogênio*

Seguindo-se a metodologia de Döbereiner et al. (1995), em meio Nfb semi-sólido (Baldani et al. 1986), avaliou-se o potencial das bactérias em fixar o nitrogênio atmosférico. O indicativo foi a formação de película de crescimento.

##### *Produção de ácido indol acético*



A quantificação de ácido indol acético (AIA) foi feita de acordo com Kuss et al. (2007), em meio DYGS. Uma curva padrão de AIA foi construída com auxina comercial e correlacionada com a absorbância da amostra bacteriana. Os valores foram expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### *Produção sideróforos e solubilização de fosfato de cálcio inorgânico*

A constatação da produção de sideróforos foi realizada pelo método universal de Schwylin e Neilands (1987), por Chrome Azurol-S (CAS) em placas de petri com meio DYGS. A solubilização de fosfato de cálcio foi realizada segundo Hara e Oliveira (2004). Halos claros ao redor da colônia, resultado positivo, foram mensurados.

#### *Produção de amônia e ácido cianídrico*

A verificação da produção de amônia foi realizada a partir da detecção da enzima urease por reação colorimétrica (Dye 1968). Para o ácido cianídrico (HCN), seguiu-se o método de Bakker e Schippers (1987), em meio King B (King et al. 1954), suplementado com 4,4 g/L de glicina.

#### *Detecção de enzimas líticas*

As bactérias foram semeadas em meio mineral contendo como única fonte de carbono: carboximetilcelulose a 0,5%, para a detecção de celulases; quitina coloidal a 0,08%, obtida segundo Moura et al.(2005), para a detecção de quitinases e 0,5% de laminarina, para detecção de  $\beta$ -1,3-glucanase (Renwick et al.1991). Na determinação da atividade amilolítica e pectinolítica utilizou-se a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), em meio mínimo M9 (Sambrook e Russell 2001) contendo 0,5% de extrato de levedura e 0,2% de amido solúvel (v/v) para teste de amilase e 0,5% de pectina (v/v) para o teste de pectinase. A atividade proteolítica dos isolados foi verificada pela degradação da caseína em meio-leite-desnatado-ágar (Berg et al.2002). Os testes mostraram-se positivos com aparecimento de halo ao redor das colônias.

#### *Atividade antifúngica*

O teste de cultura pareada foi realizado segundo Shiomi et al. (2008), em meio batata dextrose

Agar (BDA), por meio de duas estrias equidistantes e um disco de 5mm do micélio do fungo disposto no centro da placa, crescido por cinco dias. A inibição foi avaliada por medições, do raio de crescimento do fungo e comparação com o controle, não submetido a bactérias.

#### Germinação de sementes de milho inoculadas

Uma suspensão de células bacterianas foi incubada, a 30°C por 24 h a 150 rpm em meio DYGS. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 5000 g e ressuspenida em salina (NaCl 0,85%). A concentração foi ajustada para  $2 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ , em espectrofotômetro OD<sub>540</sub>, a partir de curva de crescimento exponencial realizada previamente. Um mL desta solução foi inoculada em 100 sementes de milho do híbrido comercial SX2530 (Semilia LTDA), previamente desinfestadas superficialmente (Shiomi et al. 2008) e internamente, para eliminação de fungos, em água quente (Daniels 1983), para confirmação das desinfestações amostras das sementes foram colocadas para germinar em placas de petri com meio BDA. A quantidade de células na semente foi mesurada por contagem em placa (UFC), as bactérias foram extraídas com uso de solução salina 0.085% por agitação em vortex (Silva e Reis 2004). As mesmas foram germinadas em B.O.D. a 28°C em papel filtro umedecido com água destilada. As avaliações de comprimento (cm) e volume (cm<sup>3</sup>) de raiz e hipocótilo, foram feitas aos 4 e 7 dias (Cassán et al. 2009) por meio do software Win-rhizo v. 4.0, (Regent Systems, Quebec, Canadá).

As análises estatísticas foram executadas no programa Assisat 7.6 Beta e os dados comparados a 5 % de significância.

## Resultados

#### Filogenia molecular dos isolados bacterianos

Após alinhamento das sequências do gene 16S rRNA, uma região de 1512 pb foi considerada para a análise filogenética, juntamente com espécies tipo retiradas do RDP. O isolado LGMB184 grupou-se junto ao gênero *Enterobacter* com suporte de ramo de 100%. Este mesmo isolado obteve suporte de 96% e similaridade de 98% com a estirpe tipo *E. asburiae*<sup>T</sup> JCM6051. Os seis demais isolados bacterianos pertencem ao gênero *Bacillus*. Dentre eles LGMB186 apresentou suporte de 100% e similaridade de 98% com *B. pumilus*<sup>T</sup> DSMZ27 (Fig1).

### Amplificação gene *nifH*

Os isolados *Bacillus* LGMB128, LGMB163 e a *Enterobacter*sp. LGMB184 foram positivos para amplificação do gene *nifH*, com amplificação de cerca de 780 pb.

### Caracterização enzimática e fisiológica das bactérias

Na detecção do potencial fixador de nitrogênio, todos os isolados apresentaram um indicativo positivo pelo teste de película (Tabela 1). Somente a *Enterobacter* sp. não produziu sideróforos. Entretanto todos produziram AIA com destaque para os *Bacillus* LGMB128 e LGMB135 com 105,2 e 105,11  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente. Somente *Bacillus* sp. LGMB186 produziu amônia.

Detectou-se a atividade das seguintes enzimas líticas nos isolados: celulase LGMB128, LGMB155 e LGMB163; amilase LGMB128, LGMB135, LGMB155 e LGMB163; pectinase LGMB128, LGMB135, LGMB155, LGMB163 e LGMB227; protease, por degradação da caseína LGMB135, LGMB155, LGMB163, LGMB186 e LGMB227. Todos os isolados foram negativos para os testes de solubilização de fosfato, produção de HCN, quitinase e  $\beta$ 1,3-glucanase (dados não mostrados).

### Atividade antifúngica

Os sete isolados bacterianos reduziram significativamente o crescimento dos fungos, cabendo destacar inibições superiores a 70% sobre alguns: LGMB128 (*B. maydis*, *C. graminicola* e *C. zea-maydis*), LGMB135 (*B. maydis* e *C. graminicola*), LGMB155 (*C. zea-maydis*), LGMB163, LGMB184, LGMB186 e LGMB227 (*C. graminicola* e *C. zea-maydis*) (Tabela 2).

### Germinação de sementes milho inoculadas

A inoculação resultou em  $10^7$  UFC semente<sup>-1</sup>. Os isolados *Bacillus*sp. LGMB128 e LGMB135 reduziram o percentual de germinação em cerca de 27% (Tabela 3). Ao contrário, aumentos de aproximadamente 52% foram promovidos por LGMB155, LGMB184 e LGMB186. Já LGMB163 e LGMB227 elevaram em 36,5% e 15,8% a germinação respectivamente. LGMB163, LGMB184 e LGMB186 promoveram aumento de volume radicular (14,6%, 43,9% e 39,02% respectivamente) e LGMB184 e LGMB186 também proporcionaram acréscimos no

comprimento da raiz. O comprimento e volume do hipocótilo não ultrapassaram o controle.

## Discussão

A ferramenta molecular de sequenciamento do 16S rRNA possibilita identificar gêneros bacterianos oriundos de várias espécies vegetais, com precisão: cana de açúcar (Ratón et al. 2011), milho (Pereira et al. 2011) e arroz (Beneduzi 2008). No entanto para a definição precisa de espécies e mesmo de subespécies, como por exemplo, *Bacillus subtilis* seria necessário a análise de outros genes, como o *gyrA* (Chun; Bae 2000).

A totalidade dos isolados apresentou o indicativo de fixação de nitrogênio, pela formação de película de crescimento. No entanto, apenas três (LGMB128, LGMB163 e LGMB184) amplificaram o gene *nifH*. Os genes de fixação de nitrogênio são encontrados em diversos grupos filogenéticos (Affourtit et al. 2001). Dentre eles, o *nifH* é um dos mais antigos e funcionais (Rosado et al. 1998) e sua amplificação por meio de *primers* degenerados é uma ferramenta útil para confirmar fixadores potenciais (Zehr et al. 1996).

Neste estudo todos os isolados produziram AIA em diversas quantidades. As bactérias que produziram níveis mais baixos, LGMB184 e LGMB186, tiveram melhor desempenho no alongamento e volume radicular, característica de grande interesse que proporciona maior superfície de absorção de nutrientes. Os efeitos da auxina dependem de sua concentração, ou seja, quando é baixa pode estimular o crescimento e quando é alta pode ser inibitória até mesmo da germinação (Arshad e Frankenberger 1991). Isso pode ocorrer em virtude do AIA microbiano modificar a auxina endógena da planta para um nível ótimo ou acima dele (Patten e Glick 1996). Estes fatos foram constatados por Sarwar e Kremer (1995), ao comparar a produção de auxinas entre bactérias promotoras e inibidoras de crescimento, verificando que as últimas produziram altos níveis e inibiram o crescimento da raiz de *Convolvulus arvensis*; Baranzani e Friedman (1999) observaram o mesmo efeito com *Lactuca sativa*. Araujo e Guerreiro (2010), trabalhando com *Bacillus*, constataram que a maioria dos isolados promotores de crescimento do milho não correspondia aos maiores níveis de produção do AIA. A espécie *Pseudomonas fluorescens*, cuja produção de AIA foi de apenas 15,63  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , estimulou aumento do comprimento radicular em plantas de milho, segundo Hernández-Rodríguez et al. (2008).

A capacidade de produzir sideróforos é relatada em *Bacillus* (Pereira e Castro-Silva, 2010) e *Enterobacter* (Tian et al. 2009). Dos isolados testados neste estudo, somente a

*Enterobacter* sp. (LGMB184) não o produziu. Sideróforos produzidos por bactérias que promovem o crescimento vegetal podem agir por dois mecanismos: promoção crescimento, pois o ferro está geralmente indisponível para as plantas, que dependem de quelantes orgânicos para manter um suprimento adequado (Powell et al. 1980) e, indiretamente pela privação dos patógenos da presença de ferro (Ahmad et al. 2008).

Enzimas líticas tais como  $\beta$ -1,3-glucanases, celulasas, proteases, amilases e quitinases estão ligadas a atividades hiperparasíticas (Kim; Chung, 2004), pois têm a propriedade de degradar a matriz estrutural das paredes de células fúngicas (Oppenheim e Chet, 1992). As pectinases, assim como as celulasas, também auxiliam na penetração da bactéria dentro da planta hospedeira. Podem também promover a indução de resistência sistêmica (Hallmann et al. 1997). No presente estudo, estas enzimas foram detectadas em indivíduos do gênero *Bacillus*, corroborando com Ratón et al. (2011). A ação inibitória sobre fungos fitopatógenos pode decorrer também pela amônia liberada por bactérias, relatado por Fravel (1988) com *Enterobacter cloacae* sobre *Verticillium dahliae* e *Pythium ultimum*.

No Brasil, dentre os fitopatógenos de campo que acometem o milho, *F. verticillioides* é o mais frequente (Peixoto et al. 1998). Também são comumente detectados os patógenos: *C. graminicola*, *B. maydis*, (Pinto 1998) e *C. zea-maydis*, que passou a ser importante no Brasil nas últimas décadas (Pereira et al. 2005). Dos isolados testados neste trabalho, os que mais reuniram altos percentuais de inibição, contra os quatro fungos confrontados, foram os *Bacillus* sp. LGMB128 e LGMB163. São conhecidas as habilidades antagônicas deste gênero contra diversos fungos, por exemplo: *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *M. phaseolina* (Pal et al. 2001), *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum* (Araujo e Guerreiro 2010). Uma das vantagens da estratégia de controle biológico utilizando bactérias endofíticas reside em que elas podem atuar no mesmo nicho por competição direta (Bacon e Hinton, 2002).

## Conclusão

Este estudo identificou por sequenciamento quase que total do gene 16S rRNA espécies putativas de *Enterobacter asburie* e *Bacillus pumilus* e permitiu chegar ao gênero *Bacillus* para os demais isolados. Constatou que os *Bacillus* LGMB128 e LGMB163 possuem bom desempenho antagonista contra fitopatógenos de milho. Mostrou ainda que o *Bacillus pumilus* LGMB186 e a *Enterobacter asburie* LGMB184 combinaram, a capacidade de fixar nitrogênio, com a produção de substâncias associadas à promoção de crescimento vegetal,

levando a acréscimos no percentual de germinação das sementes e melhorando o desenvolvimento inicial das plântulas, sendo estes os mais promissores para emprego na cultura do milho. Estudos futuros são necessários para testar o potencial biotecnológico destes isolados a campo, esperando contribuir como meio de fonte alternativa auxiliar no cultivo do milho. E investigar os mecanismos de inibição fúngica aqui detectados.

## Agradecimentos

À Semilia Genética e Melhoramento LTDA, pelos experimentos na obtenção dos isolados fúngicos cedidos e à equipe do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, especialmente a Jaqueline Delamuta e Renan Ribeiro, pelo apoio no sequenciamento. À Renata Rodrigues Gomes e Maicon André Wons Fernandes, pelo auxílio nos ensaios de antagonismo. Este trabalho teve o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Referências

- Affourtit J, Zehr JP, Paerl HW (2001) Distribution of nitrogen-fixing microorganisms along the Neuser river estuary, North Carolina. *Microb Ecol* 41:114-123
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 1631:73–181
- Altekar G, Dwarkadas S, Huelsenbeck JP, Ronquist F (2004) Parallel metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20:407-415
- Araujo FF, Guerreiro RT (2010) Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciênc Agrotec* 34(4):837-844
- Arshad M, Frankenberger WT (1991) Microbial production of plant hormones. *Plant Soil* 133:1-8
- Ashraf MA, Rasool M, Mirza MS (2011) Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Adv Biol Res* 5(6):348-355
- Bacon CW, Hinton DM (2002) Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biological Control* 23(3):274-284
- Bakker AW, Schippers B (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to

potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol Biochem* 19:451-457

Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen nov, sp nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 30:86-93

Barazani O, Friedman J (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *J Chem Ecol* 25(10):2397-2406

Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP (2008) Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing Bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl Soil Ecol* 39:311-320

Berg G, Roskot N, Steidle A, Eberl L, Zock A, Smalla K (2002) Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl Environ Microbiol* 68(7):3328-3338

Bernardes FS, Patrício FRA, Santos AS, Freitas SS (2010) Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. *Summa Phytopathol* 36(2):115-121

Canbolat M, Bilen S, Çakmakçı R, Sahin F, Aydi A (2006) Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42(3):350-357

Cassán F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O (2009) Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur J Soil Biol* 45:12-19

Compant S, Clément C, Sessitsch A (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 42:669-678

Chun J, Bae KS (2000) Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 78:123-127

Daniels BA (1983) Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. *Plant Disease* 67(6):609-611

Deepa CK, Dastager SG, Pandey A (2010) Plant growth-promoting activity in newly isolated *Bacillus thioparasus* (NII-0902) from Western ghat forest, India. *World J Microbiol Biotechnol*, 26(12):2277-2283. doi:10.1007/s11274-010-0418-3

Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa, Brasília

Dye DW (1968) A taxonomic study of the genus *Erwinia* 1 The "*amylovora*" group. *New Zeal J Sci* 11:590-607

Enebak SA, Wei G, Kloepper JW (1998) Effects of plant growth promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *Forest Sci* 44:139-144

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred I Accuracy assessment. *Genome Res* 8(3):175-185

Ferreira PAA, Bomfeti CA, Soares BL, Moreira FMS. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011. doi:10.1007/s11274-011-0997-7

Fravel DR (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* 26:75-91

Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43:895-914

Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607

Hara FAZ, Oliveira LA (2004) Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amaz* 34:343-357

Hernandez-Rodriguez A, Heydrich-Perez M, Acebo-Guerrero Y, Velazquez-Del Valle MG, Hernandez-Lauzardo NA (2008) Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Appl Soil Ecol* 39(2):180-186

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413-425

Ikeda AC (2010) Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.). Dissertação, Universidade Federal do Paraná

Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2004) Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96:473-480

Kim PI, Chung, KC (2004) Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol Lett* 234(1):177-183

King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44(2):301-307

Kuss AV, Kuss VV, Lovato T, Flôres MI (2007) Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. *PAB* 42:1459-1465

Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol* 147:981-993



Löytynoja A, Goldman D (2010) webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. BMC Bioinformatics. doi:10.1186/1471-2105-11-579

Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86:1-25

Menna P, Hungria M, Barcellos FG, Bangel EV, Hess PN, Martínez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29:315-332

Moura JM, Ferreira AFC, Silva FMM, Rizzi J, Pinto LAA (2005) Obtenção de quitina a partir de carapaças de siri (*Maia squinado*): uso de um planejamento experimental na etapa de desmineralização. *Vetor* 15(1):717

Nylander JAA, Wilgenbush JC, Warren DL, Swofford DL (2008) AWTY (Are We There Yet?): A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24:581-583

Oppenheim AB, Chet I (1992) Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. *Trends Biotechnol* 10:392-394

Pal KK, Tilak KVBR, Saxena AK, Dey R, Singh CS (2001) Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 156:209-223

Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42: 207-220

Peixoto AR, Torres SB, Karasawa N (1998) Qualidade sanitária de sementes de milho produzidas no submédio São Francisco. *Rev Bras Sementes* 20(1):12-15

Pereira AOP, Camargo RV, Camargo LEA (2005) Doenças do milho (*Zea mays*) In: Kimati H, Amorim L, Bergamim-Filho A, Camargo LEA (ed) *Manual de Fitopatologia - Doenças de Plantas cultivadas*, 2º vol. Ceres, Piracicaba

Pereira BA, Castro-Silva MA (2010) Rizobactérias formadoras de endósporos associadas a *Tibouchina urvilleana* de áreas impactadas por rejeitos da mineração do carvão. *Rev Bras Ciênc Solo* 34:563-567

Pereira P, Ibáñez F, Rosenblueth M, Etcheverry M, Martínez-Romero E (2011) Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L) through culture-dependent and culture-independent methods. *ISRN Ecology*. doi:105402/2011/938546.

Pinto NFJA (1998) Patologia de sementes de milho, Circular Técnica 29. Embrapa, Sete Lagoas

Posada D, Krandal KA (1988) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818

- Porwal S, Lal S, Cheema S, Kalia VC (2009) Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. PLoS ONE 4(2):e4438. doi:10.1371/journal.pone.0004438
- Powell KA, Faull JL, Renwick A (1990) The commercial and regulatory challenge In: D Horny (ed) Biological control of soilborne plant pathogens, CAB International Wallingford, United Kingdom, p445-463
- Ratón TMO, Yano R, Gámez OR, Floh EIS, Díaz MJS, Barbosa HR (2011) Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. World J Microbiol Biotechnol. doi:10.1007/s11274-011-0965-2
- Raeder U, Broda P (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett Appl Microbiol 1:17-20
- Renwick A, Campbell R, Coe S (1991) Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. Plant Pathol 40:524-532
- Rodrigues Neto J, Malavolta Júnior VA, Victor O (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* sp. citri tipo B. Summa Phytopatol 12:16
- Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften 91:552–555
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572–1574
- Rosado AS, Duarte GF, Seldin L, VanElsas JD (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments. Appl Environ Microbiol 64:2770–2779
- Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning : a laboratory manual, 3th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sarwar M, Kremer RJ (1995) Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. Plant Soil 172:261-269
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 160:4756
- Shiomi HF, Melo IS, Minhoni MTA (2008) Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. Scientia Agraria 9:535-538
- Silva MF, Reis VM (2004) Técnicas usadas para quantificar a população de bactérias diazotróficas inoculadas em sementes de milho (*Zea mays*). Embrapa, Seropédica
- Sukumaran J, Holder MT (2010) DendroPy: a Python library for phylogenetic

computing. *Bioinformatics* 26:1569-1571

Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L, Du B (2009) Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz J Microbiol* 40(2):276-284

Vale M, Seldin L, Araújo FF, Lima R (2010) Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: Maheshwari DK (ed) *Plant growth and health promoting bacteria* Springer, Berlin, pp 21-43

Wang S, Huijun W, Junqing Q, Lingli M, Jun L, Yanfei X, Xuewen G (2009) Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. *J Microbiol Biotechnol* 19(10):1250-1258

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697-703

Zehr JP, Capone DG (1996) Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. *Microb Ecol* 32:263-281

Figura 1 Árvore filogenética do gene 16S rRNA (quase total) dos isolados deste estudo e estirpes referência obtidas no RDP. Utilizados fragmento de 1512 pb após alinhamento. Dados gerados por inferência Bayesiana, como grupo externo *Alicyclobacillus herbarius*. Suportes de ramos menores que 50% não foram mostrados.

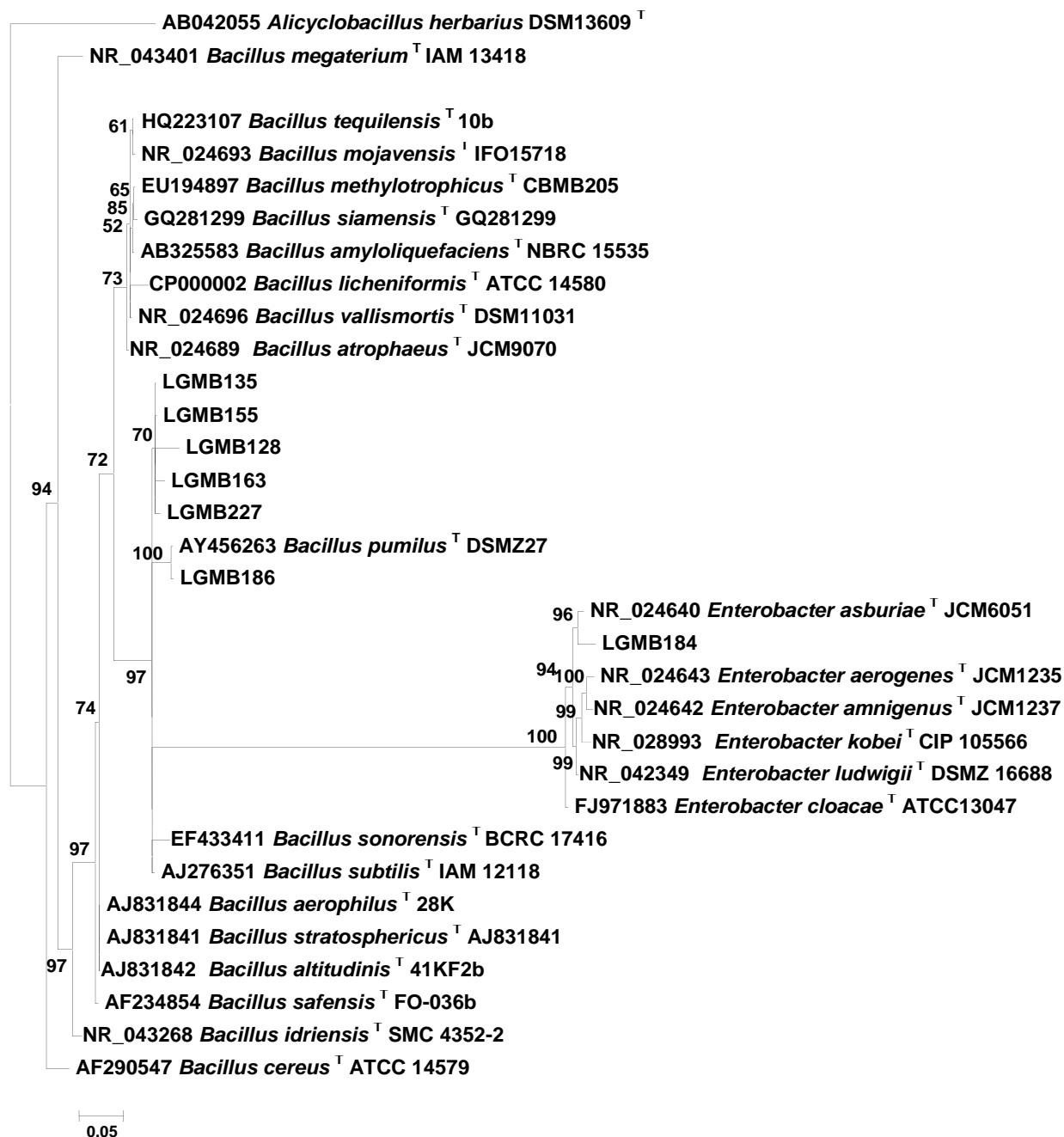


Tabela 1 Caracterização enzimática e fisiológica dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de milho. (FBN) Fixação biológica de nitrogênio.

Isolados	Auxina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Produção sideróforo	FBN	Atividade celulolítica	Atividade amilolítica	Hidrólise caseína	Atividade pectinolítica	Produção amônia
LGMB128	105,0 A	+++	+	+	+++	-	S	N
LGMB135	105,1 A	+++	+	-	++	++	S	N
LGMB155	70,1 BC	+++	+	+	+++	++	S	N
LGMB163	96,3 AB	+++	+	++	+++	+	S	N
LGMB184	52,6 C	-	+	-	-	-	N	N
LGMB186	35,1 C	+	+	-	-	++	N	S
LGMB227	70,1 AB	++	+	-	-	+	S	N
MG	0,7							
CV%	21,0							

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade; (MG) média geral, (CV%) coeficiente de variação percentual; (-) negativo, (+) fraco, (++) moderado, (+++) forte; (S) positivo, (N) negativo.

Tabela 2 Atividade antifúngica dos isolados bacterianos, representada pela média do raio da colônia do fungo (cm) e pelo percentual (%) de inibição que o isolado bacteriano promoveu sobre o crescimento fúngico. O controle não estava submetido a bactéria.

Isolados	<i>B. maydis</i>		<i>C. graminicola</i> *		<i>F. verticillioides</i>		<i>C. zea-maydis</i>					
	cm	%	cm	%	cm	%	cm	%				
Controle	3,6	A	3,4	A	2,7	A	2,4	A				
LGMB128	0,9	G	73,5	1,0	C	70,6	1,0	C	60,1	0,5	E	77,9
LGMB135	1,1	F	70,8	0,9	CD	71,8	1,1	C	57,5	1,3	B	45,8
LGMB155	2,2	C	38,6	1,1	B	67,6	1,1	C	57,5	0,6	C	75,0
LGMB163	1,1	E	68,9	0,9	DE	72,6	0,9	D	67,7	0,6	C	75,0
LGMB184	2,3	C	37,7	1,0	CD	70,6	1,8	B	31,2	0,6	C	75,0
LGMB186	3,5	B	3,6	0,8	F	75,6	1,8	B	31,2	0,6	C	75,0
LGMB227	1,8	D	49,6	0,9	EF	73,5	1,1	C	57,5	0,6	D	76,6
DMS	3,5		8,6		7,0		6,2					

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 1% de probabilidade; (\*) teste a 5% de probabilidade. (DMS) Diferença Mínima Significativa.

Tabela 3 Médias da germinação de sementes de milho, com 4 e 7 dias, submetidas à inoculação com os isolados bacterianos, na concentração de  $2 \times 10^9$  e concentração de  $10^7$  semente<sup>-1</sup>. Controle usou-se apenas salina. Comprimento (mm), volume (mm<sup>3</sup>). Germinação das sementes está expresso em percentual.

Isolados	Raiz		Hipocótilo		Germinação
	Comprimento	Volume	Comprimento	Volume	%
Controle	80,2 D	0,4 C	154,6 A	5,0 A	63 E
LGMB128	20,7 H	0,1 E	43,3 G	1,2 H	47 F
LGMB135	68,3 E	4,8 B	74,5 E	2,6 E	44 G
LGMB155	48,0 G	0,3 D	89,0 D	2,8 D	98 A*
LGMB163	83,0 C*	0,5 BC	101,0 B	3,1 C	84 C*
LGMB184	103,8 B*	0,6 A*	41,9 H	1,6 G	90 B*
LGMB186	107,5 A*	0,6 A*	94,8 C	3,9 B	98 A*
LGMB227	61,4 F	0,4 C	55,8 F	1,9 F	73 D*
DMS	5,7	21	14	16	2,2

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. (MG) média geral, (CV%) coeficiente de variação percentual. (\*) Tratamentos significativamente superiores ao controle.

## 5ARTIGO 2

### “Diversidade genética de fungos associados a folhas de duas linhagens de milho (*Zea mays* L.)”

#### Resumo

Objetivou-se realizar um levantamento dos fungos associados a folhas de duas linhagens de milho e analisar a diversidade da microflora presente. Os isolados foram identificados por meio de caracterização morfológica e taxonomia molecular da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA. Obtiveram-se 27 fungos, 15 deles provenientes da linhagem 1, onde predominaram indivíduos da classe Dothideomycetes com 86,7% (*P. sorghina*, *E. nigrum*, *Cladosporium* sp., *Bipolaris zeicola.*, complexo *A. alternata*-AAC) e 13,3% de Sordariomycetes (*Phomopsis* sp. e *Nigrospora* sp.); para a linhagem 2 a proporção das ordens foi inversa, 25,0% de Dothideomycetes (*E. nigrum* e Pleosporales) e 75,0% de Sordariomycetes (complexo *G. fujikuroi*-GFC, complexo *F. graminearum*-FgC, *Phomopsis* sp. e *Nigrospora* sp.). Este estudo possibilitou por características morfológicas e filogenia molecular, identificar fungos de grupos saprófitas, micotóxicos e fitopatogênicos co-habitando tecidos foliares de milho e de maneira diferencial para as duas linhagens avaliadas.

**Palavras-chave:** Filogenia molecular, ITS1-5.8S-ITS2, endofíticos, microflora.



## Abstract

The objective was to study fungi associated with leaves from two maize hybrid varieties and analyze microflora diversity. Fungi isolates were identified by morphological and molecular taxonomy by ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region amplification and Maximum Likelihood phylogenetic analysis. Twenty-seven fungi were obtained, fifteen from hybrid one, in which predominated Dothideomycetes class (about 86.7%: *P.sorghina*, *E. nigrum*, *Cladosporium* sp. *Cochliobolus* sp. Complex A. *alternata*-AAC) and 13.3% Sordariomycetes (*Phomopsis* sp. and *Nigrospora* sp.). From hybrid two, ratio was reversed: 25.0% Dothideomycetes (*E. nigrum* and *Pleosporales*) and 75.0% Sordariomycetes (Complex G. *fujikuroi*-GFC, Complex F. *graminearum*-FGC, *Phomopsis* sp. and *Nigrospora* sp.). In this study, it was observed fungi identification by morphological and molecular phylogeny, since order until species of saprophytic, phytopathogenic and micotoxinic fungi which co-habit corn leaf tissue differentially for both maize varieties analyzed.

**Keywords:** Molecular Phylogeny, ITS1-5.8S-ITS2, endophytic mycoflora.

## Introdução

O milho (*Zea mays* L.) tem alto impacto econômico na agricultura brasileira. Isso ocorre, por ser uma *commodity* em ascensão no mercado internacional e em função de sua extensa cadeia produtiva. Além disso, é peça fundamental na composição do sistema de rotação de culturas (Bono et al. 2008).

As folhas representam uma das interfaces mais dinâmicas das plantas. Fungos que habitam este tecido compartilham características que permitem a eles, crescer e persistir em um ambiente em constante mudança bioquímica, que se deve principalmente às diversas fases de desenvolvimento da planta (Juniper 1991).

O mutualismo de plantas e fungos endofíticos leva a consequências desejadas, como a diminuição da herbivoria (Sieber 2007), aumento da resistência à seca (Hyde e Soyong 2008), promoção de crescimento vegetal (Ting et al. 2008) e controle de insetos e fungos fitopatogênicos (Ownley et al. 2010; Orole e Adejumo 2009).

No entanto, os fungos também são os principais microrganismos causadores de perdas de produtividade na cultura do milho (Shurtleff 1992), pelo do apodrecimento

da semente, morte da plântula (Reis et al. 2004) e danos no período de armazenagem dos grãos (Tanaka et al. 2001). Além disso, as sementes contaminadas quando ingeridas, podem levar a intoxicações graves (Harrison et al. 1990; Kellerman et al. 1990; Bills et al. 1992; Scott 2001; Pinto et al. 2007).

A análise de sequências de rDNA vêm sendo utilizadas na identificação e para estimar a diversidade de fungos endofíticos. Dentro do locus rDNA, a região ITS tem sido particularmente útil para a análise de espécies fúngicas de diversos gêneros (Yuan et al. 2010; Koukol et al. 2011), pois possui múltiplas cópias no genoma e sua região poder ser amplificada por *primers* universais (Gardens e Bruns, 1993). Inclusive vem sendo usado, desde o ano de 2007 como marcador de código de barras (*barcoding*) primário para fungos (Bellemain et al. 2010).

Tem-se reconhecido que a interação dos microrganismos e seus hospedeiros podem ser influenciadas por vários aspectos, como: a diversidade genética dos simbioses, as maneiras pelas quais eles são adquiridos do ambiente e sua capacidade individual de colonizar os hospedeiros, além das interações diretas e indiretas com ambiente, e a própria história evolutiva de cada um. Todos estes aspectos ainda estão envolvidos pela arquitetura genômica, a qual está associada à patogenicidade ou outros modos ecológicos de interação (endofitismo ou saprofitismo) (Herre et al. 1999; Maynard Smith e Szathmary, 1997).

Este estudo teve por objetivo realizar levantamento dos fungos associados a folhas de duas linhagens de milho, utilizando características morfológicas e taxonomia molecular e analisar a diversidade genética presente.

## **Materiais e Métodos**

### Isolamento

As amostras foliares foram coletadas de duas linhagens (L1 e L2) de milho (*Zea mays* L.). Ambas apresentavam lesões, L1 tinha manchas características de cercosporiose, cujo agente etiológico conhecido é *Cercospora zea-maydis* e L2 com manchas típicas de lesão de *Exserohilum turcicum*. As plantas estavam na fase fenológica de enchimento dos grãos. E foram cultivadas a campo na estação experimental da empresa Semília Genética e Melhoramento LTDA, região de Campo Largo, Paraná, Brasil. O sistema de plantio foi o direto sem rotação de culturas.

O isolamento dos fungos foi realizado como descrito por Petrini (1986) e adaptado por Glienke-Blanco et al. (2002), no qual, folhas foram lavadas com água corrente e em seguida, tratadas com etanol 70% (v/v) por 1 min, NaClO 3% (v/v) por 4 min, etanol 70% (v/v) por 30 s e 3 lavagens consecutivas em água. Cinco fragmentos (5-7 mm) por placa foram incubados a 28°C no escuro, em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) acrescido de tetraciclina (100 µg/mL).

### Caracterização morfológica

As colônias obtidas foram agrupadas em morfotipos por características micromorfológicas (estruturas de reprodução) por meio da técnica de microcultivo (Kern e Blevins 1999) e macromorfológicas (e.g. cor, estrutura da colônia e velocidade de crescimento). Em meio BDA e STT, foram incubadas a 28°C, por 7, 14 e 21 dias (Brunelli et al.2006). As lâminas foram coradas com lactofenol azul de algodão e visualizadas em microscópio óptico. Quando possível, os caracteres morfológicos foram comparados em chaves taxonômicas (Griffin 1993; Seifert 1996; Watanabe 2002; Bensch et al. 2010)

Os isolados foram depositados na coleção de microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos (LABGEM) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. Para preservação utilizaram-se tubos inclinados contendo meio BDA, mantidos a 4°C e também armazenaram-se discos de meio de cultivo com micélio em água destilada à temperatura ambiente (Castellani 1967).

### Extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit, (MoBio<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. O DNA foi ressuspendido em 20 µL de água ultrapura. A integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), corado com GelRed<sup>™</sup> (Biotium, Estados Unidos) diluído em Tampão de Amostra para 100X, observado em transluminador de ultravioleta (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e fotodocumentado (Programa Digidoc it). A quantificação e pureza foram avaliadas

em espectrofotômetro (por comprimento de onda) NanoDrop 2000<sup>®</sup> (Thermo Scientific).

A amplificação das regiões ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando os *primers* V9G (De Hoog e Gerrits Van Den Ende 1998) e ITS4 (White et al. 1990) com 10 ng de DNA, tampão de PCR 1X, 0,5U de *Taq* polimerase, 0,1  $\mu$ M de primers (1,25 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e volume final de 12,5  $\mu$ L. A desnaturação inicial foi a 94°C por 2 min, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C, e extensão final de 3 min a 72°C. A verificação da integridade do DNA foi realizada como descrito acima em gel de agarose a 1,5% (p/v). A purificação com acetato de amônio 7,5 M foi realizada segundo Menna et al. (2006). Água ultrapura foi usada para ressuspender o DNA. A quantidade e pureza foram avaliadas em espectrofotômetro como descrito acima, ajustando a concentração final para 10 ng/ $\mu$ L.

Para a reação de sequenciamento, adicionaram-se 50 ng do DNA purificado, 1  $\mu$ M de primer, 2  $\mu$ L da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace, Amersham Bioscience<sup>®</sup>) e água ultrapura para completar um volume final de 10  $\mu$ L. A amplificação foi realizada por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 15 s a 50°C e 60 s a 60°C.

Após a amplificação, a purificação foi feita em placa com o gel de filtração Sephadex<sup>™</sup> G-50 medium (GE Healthcare<sup>®</sup>) e então submetido à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE1000 (Amersham Biosciences<sup>®</sup>).

### Análises filogenéticas

A verificação da qualidade das bases foi feita no programa Phred (Ewing et al. 1998). As sequências foram comparadas no BlastN e os isolados referência foram captados no banco de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Os alinhamentos foram realizados no programa PRANK (Löytynoja e Goldman 2010). Para busca das árvores de Máxima Verossimilhança foram utilizadas as configurações de algoritmo padrão no programa GARLI 2.0 (Zwickl 2006). As análises de bootstrap foram feitas com 1.000 repetições, no programa DendroPy versão 3.8.1 (Sukumaran e Holder 2010).

## Diversidade e associações ecológicas

A diversidade fúngica foi estimada pelos índices de Shannon-Weaver que geralmente varia entre 1 e 3,5 e assume pesos iguais entre espécies raras e abundantes (Shannon e Weaver 1949) além de ser sensível à presença de tipos raros (Peet, 1974). Foi também estimada pelo índice de Simpson, que indica valores entre 0 e 1, dá maior peso a espécies comuns (Simpson 1949) e estabiliza com menores tamanhos de amostras (Gimaret-Carpentier et al. 1998). Ambos consideram que quanto maior o valor, maior a diversidade. Estes índices foram aplicados para o total de isolados e para cada híbrido utilizando o programa PAST (Hammer et al. 2001).

## Resultados

### Isolamento

Os 27 fungos obtidos do isolamento das folhas de milho, de duas linhagens (L1 e L2), foram classificados por características morfológicas. Destes, 15 foram isolados do L1 e 12 do L2. Visualizaram-se as estruturas de reprodução de 92,6% (n=25) dos fungos (Tabela 1).

### Identificação

Da linhagem 1 obtiveram-se 86,7% (n=13) de Dothideomycetes (*P. sorghina*, *E. nigrum*, *Cladosporium* sp., *Cochliobolus* sp., complexo *A. alternata*-AAC) e 13,3% de Sordariomycetes (*Phomopsis* sp. e *Nigrospora* sp.); para a linhagem 2 a proporção das ordens foi inversa, 25,0% de Dothideomycetes (*E. nigrum* e Pleosporales) e 75,0% de Sordariomycetes (complexo *G. fujikuroi*-GFC, complexo *F. graminearum*-FgC, *Phomopsis* sp. e *Nigrospora* sp.).

### Análises filogenéticas

Foram construídas árvores filogenéticas por Máxima Verossimilhança. Dentre estes fungos, 1 classificou-se dentro da ordem Pleosporales (LGMF1041). Do restante foi

possível atribuir gênero a 7 fungos: LGMF1026, LGMF1040 e LGMF1245(*Phomopsis*); LGMF1020 (*Cladosporium*) e LGMF1017, LGMF1038 e LGMF1039 (*Nigrospora*). Posicionaram-se 7 indivíduos em 3 grupos de espécies complexas: complexo *Alternaria alternata* (AAC) (LGMF1018 e LGMF1021), com suporte de ramo de 99%; complexo *Fusarium graminearum* (FgC) (LGMF1036 e LGMF1037) e complexo *Gibberella fujikuroi* (GFC) (LGMF1049, LGMF1050 e LGMF1243) com suporte de 93% e 82% respectivamente (Fig 1).

Os isolados LGMF1013 e LGMF1022 agruparam-se fortemente junto a espécie *Bipolaris zeicola*, com suporte de ramo de 98%. Ambas apresentaram similaridade de 100% com *B. zeicola* ATCC 48129 (Tabela 1).

O LGMF1014, LGMF1016, LGMF1019, LGMF1024, LGMF1025 LGMF1042 e LGMF1043 foram enquadrados junto ao grupo de *Epicoccum nigrum*. Todos com similaridade de 99% com *E. nigrum* CBS 115825 exceto LGMB1042 com 98%.

No clado de *Phoma sorghina* agruparam-se LGMF1015, LGMF1023 e LGMF1051. Os três possuem maior similaridade com *P. sorghina* PD88/549, os dois primeiros com 99% e o último com 96%.

#### Diversidade e associações ecológicas

A ordem mais representativa foi Pleoporales com 15 isolados (55,5%), 12 advindos do L1 e 3 do L2. Seguido tem-se a ordem Hypocreales com 5 fungos (18,5%), sendo todos isolados a partir da linhagem L2 de milho. Diaporthales e Trichosphaerales contribuíram com 3 isolados cada, sendo um do L1 e dois do L2 para ambas. E Capnodiales, a menos representativa, com 1 isolado oriundo do L1.

Os gêneros predominantes nas linhagens L1 e L2 foram respectivamente *Phoma* (58%) e *Fusarium* (42%). A linhagem1 totalizou 6 gêneros e a linhagem 2 reuniu 4 (Fig 2).

A riqueza de espécie (S) total foi de 13. E (S) para L1 e L2 foi 8 e 6 respectivamente. O índice de diversidade de Shannon-Weiner e Simpson para o total de isolados das duas linhagens foi  $H'=2,067$  e  $1-D=0,855$ . Comparando a diversidade de L1 e L2 tem-se:  $H'=1,767$  e  $1-D=0,80$  para L1 e ( $H'=1,594$  e  $1-D=0,7934$ ) para L2.

#### Discussão

Comumente a identificação de fungos envolve análises de caracteres morfológicos por meio de micro cultivo e auxílio de chaves taxonômicas, além de análises filogenéticas. Este conjunto de técnicas favorece uma identificação mais precisa (Bernardi-Wenzel et al. 2010). Nesse contexto a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA vem sendo empregada com sucesso para inúmeros taxa (Bhagat et al. 2011; Sun et al. 2011).

Neste estudo, a espécie mais abundante foi *Epicoccum nigrum* [Punith., M.C. Tulloch e C.M. Leach 1972] fungo ubíquo que pode exibir um estilo de vida endofítica (Arnold 2007; Schulz e Boyle 2005), mas também está associado com a decomposição primária de tecidos vegetais (Mims e Richardson 2005). *E. nigrum* tem sido usado como um agente de controle biológico, por exemplo, contra *Monilinia spp.* em pêssegos e nectarinas (De Cal et al. 2009) e contra *Pythium* em algodão (Hashem e Ali 2004).

Já foi descrito que espécimes de *Phoma sorghina* [(Sacc.) Boerema, Dorenb. e Kesteren 1973] são morfológicamente e filogeneticamente muito diversificadas (Aveskamp et al. 2009, Pažoutová 2009) e provavelmente, representam múltiplas espécies (Aveskamp et al. 2010). Esta espécie também é agente etiológico da mancha foliar de *Phaeosphaeria* em milho, juntamente com *Phaeosphaeria maydis* (Amaral et al 2003).

A mancha de Bipolaris, causada por *Bipolaris zeicola* [(G.L. Stout) Shoemaker 1959] se encontra bem distribuída no Brasil, com severidade entre baixa e média. Atualmente, em algumas áreas das regiões Centro-Oeste e Nordeste têm ocorrido com elevada severidade em cultivares suscetíveis (Costa et al. 2010). Corroborando com os dados deste estudo, com a região ITS diferencia espécies de *Cochliobolus* que inclui *C. heterostrophus*, *C. carbonum* e *C. victoriae*, *B. sacchari* e *B. sorghicola* (Berbee, 1996).

O complexo *Alternaria alternata* (AAC) é um grupo, com poucos caracteres morfológicos ou moleculares que permitem discriminação inequívoca entre taxa (Andrew et al. 2009). Não houve diferenciação entre os membros deste grupo pela análise da subunidade mitocondrial ribossomal maior (mtLSU), betatubulina (Bt), actina (ACT), calmodulina (CAM), quitina sintase, fator de alongamento alfa (EF) e 1,3,8-trihydroxynaphthalene redutase (Peever et al. 2004). Consequentemente, ainda não está claro como este clado deve ser considerado filogeneticamente (Andrew et al. 2009). A espécie *A. alternata* é, comumente, associada a plantas de

interesse alimentício, que podem causar deterioração durante o transporte e o armazenamento. É responsável pela produção de uma série de micotoxinas, que incluem o alternariol (AOH), éter alternariol monometil (AME), altenuene (ALT), altertoxins I, II e III (ATX-I, -II e -III), e L-ácido tenuazonic (TeA) (Scott 2001).

O gênero *Fusarium* está extremamente difundido, a prova disso é que pelo menos 80% de todas as plantas cultivadas estão associadas a pelo menos uma doença causada por uma de suas espécies (Leslie e Summerell 2006). Plantas de milho assintomáticas, para podridão de colmo, mas infectadas por *F. moniliforme* podem apresentar reduções de 50% da capacidade fotossintética. Isto implica na diminuição dos componentes de transporte de elétrons e uma consequente redução na síntese de carboidratos, sendo possivelmente causada por toxinas produzidas pelos fungos (Pinto et al. 2000). As espécies *F. verticillioides* e *F. subglutinans* produzem toxinas como: tricotecenos, desoxinivalenol, zearalenona e fumonisina B1 (Pinto et al. 2007).

Para o complexo de espécies de *F. graminearum*, caracteres morfológicos e sequenciamento de ITS-5.8S-ITS2 do rDNA não são suficientes para a identificação precisa de isolados ao nível de espécies (O'Donnell et al. 2000). Portanto, a determinação das espécies que compõe este complexo foi feita baseando-se em análises multigênicas, de até 13 genes, ficando resolvida em 13 espécies: *Fusarium acacia-mearnsii*, *Fusarium aethiopicum*, *Fusarium asiaticum*, *Fusarium austroamericanum*, *Fusarium boothii*, *Fusarium brasiliense*, *Fusarium cortaderiae*, *Fusarium gerlachii*, *F. graminearum sensu stricto*, *Fusarium meridionale*, *Fusarium mesoamericanum*, *Fusarium ussuriense*, e *Fusarium vorosii* (O'Donnell et al. 2004; Starkey et al. 2007; O'Donnell et al. 2008; Yli-Mattila et al. 2009). Membros do *Fg* complex são agentes causais da podridão da ponta da espiga em milho (Sampietro et al. 2011) juntamente com *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. avenaceum* e *F. subglutinans* (Bottalico 1998; Lew et al. 1991). Além disso, *F. graminearum* e *F. culmorum* causam podridão de colmo (Munkwold et al. 1997; Pronczuk et al. 1991). Todas as espécies *Fg* complex produzem toxinas do grupo de tricotecenos tipo B (O'Donnell et al. 2008) e zearalonas assim como *F. culmorum* e *F. cerealis* (IARC, 1993).

O gênero *Nigrospora* é insuficientemente descrito em bancos de dados de sequências depositadas, como por exemplo, o Genbank, que contém somente duas espécies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Este fato dificulta a consolidação de



estudos de filogenia deste gênero, que aparece no presente trabalho como colonizador endofítico das duas linhagens de milho.

Alguns outros grupos requerem análises multigênicas para clara distinção de sua posição taxonômica, como: o gênero *Cladosporium* (Schubert et al. 2009), principalmente para complexos de espécies como *C. cladosporioides* (Bensch et al. 2010) e *Phomopsis* (van Rensburg et al. 2006; Lamprecht et al. 2011).

A maioria das espécies de endófitos foliares pertence à classe Dothideomycetes e Sordariomycetes (Arnold et al. 2009). Isso representa mais de 75% dos endófitos distribuídos desde o ártico até os trópicos. A abundância de ambos varia em função da latitude (Arnold e Lutzoni 2007), de sua diversidade genética, do genótipo do hospedeiro, da maneira pelas quais eles são adquiridos do ambiente e de sua capacidade individual de co-colonizar os hospedeiros (Herre et al. 1999; Maynard Smith e Szathmary, 1997).

Os gêneros de fungos relatados neste estudo já foram associados a milho. Alguns em tecidos vegetativos como: *Cochliobolus*, *Epicoccum*, *Phoma*, e *Phomopsis* (Pan et al. 2008). E outros em sementes como, *Nigrospora* sp. e todos os já mencionados acima (Niaz e Dawar 2009). *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* são considerados fungos de campo que invadem os grãos no estágio de pré ou pós-colheita antes do debulhamento e causam danos (Watson e Ramstad 1987). *Epicoccum* e *Nigrospora* desenvolvem-se nos grãos próximo ao período de pós-colheita ou armazenagem interferindo na sanidade do grão (Marsh e Payne 1984). Os dois principais problemas causados por estes fungos no milho são: a perda de peso/descoloração/necrose dos grãos e a produção de micotoxinas, que é um fator decisivo na liberação de produtos agrícolas no comércio internacional (Julian et al. 1995). A presença de micotoxinas, além de serem prejudiciais à saúde, leva a importantes perdas econômicas para os agricultores (Chassy 2010).

Estes grupos de fungos ainda podem ser encontrados em outros hospedeiros: plantas medicinais (Bernardi-Wenzel et al. 2010; Bhagat et al. 2011); arbóreas (*Acer truncatum*) (Sun et al. 2011) e gramíneas como arroz (Yuan et al. 2010). No entanto, há indicações filogenéticas de que alguns isolados deste estudo pertencem a espécies cujas sequências, não estão disponíveis nos bancos de dados.

A abundância, diversidade e composição de espécies de endófitos são influenciadas pelo micro-habitat, por condições microclimáticas (Arnold e Herre 2003) e pela dinâmica da transmissão horizontal e vertical de microrganismos (Arnold 2007). A

horizontal pode ser constatada em estudos com mudas livres de endófitos, que foram cultivadas em condições estéreis (Arnold e Engelbrecht 2007). Ou, ainda, observando alta diversidade de endófitos no tecido, o que sugere que tais comunidades representavam a colonização do ambiente externo (Fröhlich et al. 2000). Já a transferência vertical foi verificada com *Penicillium oxalicum* em folhas, caules e raízes de plantas cultivadas em condição estéril (Posada e Vega 2005) e com *Fusarium* spp. colonizando sementes de feijão-caupi (Rodrigues e Menezes 2005). Além disso, genótipo do hospedeiro pode influenciar na biodiversidade dos fungos endofíticos (Pan et al. 2008) e afetar a variação genética de endófitos (Ahlholm et al. 2002).

A literatura sugere que um número significativo de fungos, pode apresentar múltiplos papéis ecológicos. Patógenos fúngicos podem habitar diferentes hospedeiros, em diferentes fases da vida, como modos distintos de interação (Agrios 2005). Ou ainda endófitos podem assumir a condição saprófita quando a folha atinge a senescência (Korkama-Rajala et al. 2008). Por exemplo, o fungo *F. verticillioides* é comumente isolado de plantas de milho, mesmo na ausência de sintomas visíveis. Neste estado temporariamente endofítico ele pode contribuir para o acúmulo de micotoxinas (Bacon e Hinton, 1996). E somente quando as plantas passam por situações de estresse biótico ou abiótico, eles desenvolvem os sintomas típicos da doença (Bottalico et al., 1989). Neste mesmo contexto, *Chaetomium globosum* é conhecido como endófito, saprófita e patógeno (Arnold et al., 2009). Portanto, a distinção entre microrganismos endofíticos, fitopatogênicos e oportunistas é puramente didática. Há um gradiente tênue que os separa, sendo assim é difícil impor limites para separar cada categoria (Azevedo et al. 2000).

## **Conclusão**

Este estudo possibilitou sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, identificar fungos de espécies saprófitas, micotóxicas e fitopatogênicas co-habitando tecido foliar de milho, de maneira diferencial os dois genótipos homozigotos (linhagens). Indicou ainda a necessidade de ampliação estudos da microflora endofítica associada a esta cultura, para melhor compreender a dinâmica dos riscos associados a alteração da condição saprófita de fungos que dá lugar à sua manifestação fitopatológica, fenômeno normalmente disparado por oscilações

ambientais.

## **Agradecimentos**

Agradecemos a Vania Portes da Semilia Genética e Melhoramento LTD pela coleta do tecido foliar, também a Renan Ribeiro, Jakeline Delamuta (Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja) e a Juliana Marta Muehlmann Fisher (LabGeM) pelo apoio no sequenciamento. Este trabalho tem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Referências**

Agrios GN (2005) Plant Pathology, fifth edn. Elsevier Academic Press, London

Ahlholm JU, Helander M, Henriksson J, Metzler M, Saikkonen K(2002) Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees. *Evolution* 56:1566-1573

Amaral AL, Carli ML, Barbosa Neto JF, Dal Soglio FK (2003) *Phoma sorghina* a new pathogen associated with *Phaeosphaeria* leaf spot on maize in Brazil. *New Disease Reports* 8:26

Andrew M, Peever TL, Pryor BM (2009) An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the smallspored *Alternaria* species complex *Mycologia* 101(1):95–109

Arnold AE, Herre EA (2003) Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95:388–398

Arnold AE (2007) Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress challenges and frontiers. *Fungal Biol Rev* 21:51-66

Arnold AE, Engelbrecht BMJ (2007) Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. *J Trop Ecol* 23:369-372

Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88:541-549

Arnold AE, Henk DA, Eells RA, Lutzoni F, Vilgalys R (2007) Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* 99:185–206

Arnold A E, Miadlikowska J, Higgins K L, Sarvate S D, Gugger P, Way A, Hofstetter V, Kauff F, Lutzoni F (2009) A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: Are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? *Syst Biol* 58:283-297

Aveskamp MM, Verkley GJM, De Gruyter J, Murace MA, Perello A, Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Crous PW (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101:359–378

Aveskamp MM, De Gruyter J, Woudenberg JHC, Verkley GJM, Crous PW (2010) Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Stud Mycol* 65:1–60

Azevedo JL, Júnior WM, Pereira JO, Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Environ Biotechnol* 3(1):40-65

Bacon CW, Hinton DM (1996) Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Can J Bot* 74:1195–1202

Bhagat J, Kaur A, Sharma M, Saxena AK, Chadha BS (2011) Molecular and functional characterization of endophytic fungi from traditional medicinal plants. *World J Microbiol Biotechnol* doi:10.1007/s11274-011-0894-0

Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kausserud H (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10(189):1-9

Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemsse M, Andersen B, Summerell BA, Shin H-D, Dugan FM, Schroers H-J, Braun U, Crous PW (2010) Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae Capnodiales). *Stud Mycol* 67:1–94

Berbee ML (1996) Loculoascomycete origins and evolution of filamentous Ascomycete morphology based on 18S gene sequence data. *Mol Biol Evol*13:462-470

Bernardi-Wenzel J, García A, Filho-Celso JR, Prioli AJ, Pamphile JA (2010) Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biol Res* 43(4)375-384

Bills GF, Giacobre RA, Lee SH, Pelaez F, Tkacz JS (1992) Tremorgenic mycotoxins paspalitrem A and C from a tropical *Phomopsis*. *Mycol Res*96(11)977-983

Bono J, Rodrigues A, Mauad M, Albuquerque J, Yamamoto C, Chermouth K, Freitas M (2008) Modo de aplicação de fertilizantes nitrogenados na qualidade fisiológica de sementes de milho. *Agrarian* 1(2)91-102

Bottalico A, Logrieco A, Visconti A (1989) *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. *Mycopathologia* 107:85–92

Bottalico A (1998) *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxins profiles in Europe. *J Plant Pathol* 80:85–103

Brunelli KR, Fazza AC, Athayde Sobrinho C, Camargo LEA (2006) Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zae-maydis*. *Summa Phytopathol* 32:92-94

Castellani A (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. *Am J Trop Med Hyg* 42:181-184

Chassy BM (2010) Food safety risks and consumer health. *New Biotechnol* 27:534–544

Costa RV, Casela CR, Cota LV (2010) Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção 1 Cultivo do Milho Doenças 6ª edição. [http://www.cnpmsembrapabr/publicacoes/milho\\_6\\_ed/doencashtm](http://www.cnpmsembrapabr/publicacoes/milho_6_ed/doencashtm) Accessed 15 January 2011

De Cal MA, Larena I, Liñán M, Torres R, Lamarca N, Usall J, Domenichini P, Bellini A, de Eribe XO, Melgarejo P (2009) Population dynamics of *Epicoccum nigrum* a

- biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *J Appl Microbiol* 106:592–605
- De Hoog GS, Gerrits Van Den Ende AHG (1998) Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycoses* 41:183-189
- Ewing B, Hillier L, Wendl M C, Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred I Accuracy assessment. *Genome Res* 8(3):175-185
- Fröhlich J, Hyde KD, Petrini O (2000) Endophytic fungi associated with palms. *Mycol Res* 104:1202–1212
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2:113-118
- Gimaret-Carpentier CR, Pélissier J, Paschal P, Houllier F (1998) Sampling strategies for the assessment of tree species diversity. *J Veg Sci* 9:161-172
- Glienke-Blanco C, Aguilar-Vildoso CI, Vieira MLC, Barroso PAV, Azevedo JL (2002) Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. *Genet Mol Biol* 25:251-255
- Griffin DH (1993) *Fungal Physiology*. Wiley-Liss Inc, New York
- Herre EA, Knowlton N, Mueller UG, Rehner SA (1999) The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol Evol* 14:49–53
- Harrison LR, Colvin BN, Greene JT, Newman LE, Cole RJ (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest* 2:217-221
- Hashem M, Ali EH (2004) *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root rot of cotton seedlings. *Arch Phytopathology Plant Protect* 37:283–297
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electron* 4:4–9
- Hyde KD, Soyong K (2008) The fungal endophyte dilemma? *Fungal Divers* 33:63–

173

IARC International Agency for Research on Cancer (1993) Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins In: \_\_\_\_ Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risks to Humans, vol 56 International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp 397–444, 445–466 and 467–488

Julian AM, Wareing PW, Phillips SI, Medlock VFP, Macdonald MV, Río LE (1995) Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and postharvest maize in Honduras. *Mycopathologia* 129:5-16

Juniper BE (1991) The leaf from the inside and the outside: a microbe's perspective In: Andrews JH, Hirano SS (ed) *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York, pp 21–42

Kellerman TS, Marasas WFO, Thiel PG, Gelderblom WCA, Cawood M, Coetzer JAW (1990) Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort J Vet Res* 57 269-275

Kern ME, Blevins KS (1999) *Micologia médica: texto e atlas*. Premier, São Paulo

Korkama-Rajala T, Müller MM, Pennanen T (2008) Decomposition and fungi of needle litter from slow- and fast-growing norway spruce (*Picea abies*) clones. *Microbial Ecol* 56:76–89

Koukol O, Kolařík M, Kolářová Z, Baldrian P (2011) Diversity of foliar endophytes in wind-fallen *Picea abies* trees. *Fungal Divers* doi:10.1007/s13225-011-0112-2

Lamprecht SC, Crous PW, Groenewald JZ, Tewoldemedhin YT, Marasas WFO (2011) Diaporthaceae associated with root and crown rot of maize. *IMA Fungus* 2(1)13–24

Leslie J F, Summerell B A (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Ltd, Iowa

Lew H, Adler A, Edinger W (1991) Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Mycotoxin Res* 7A:71–76

Löytynoja A, Goldman D (2010) webPRANK: a phylogenyaware multiple sequence aligner with interactive alignment browser. *BMC Bioinformatics* 11:579

Marsh SF, Payne A (1984) Pre-harvest infection of corn silk and kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathol* 74:1284-1289

Maynard-Smith J, Szathmary E (1997) The major transitions in evolution. Oxford University Press, New York

Menna P, Hungria M, Barcellosa FG, Bangele EV, Hessf PN, Martinez-Romero E (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst Appl Microbiol* 29:315-332

Mims CW, Richardson EA (2005) Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. *Can J Bot* 83:1354–1363

Munkvold GP, Mcgee DC, Carlton WM (1997) Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathol* 87:209–217

Niaz I, Dawar S (2009) Detection of seed borne mycoflora in maize (*Zea mays* L.). *Pakistan J Bot* 41:443-451

O'Donnell K, Kistler HC, Tacke BK, Caspar HH (2000) Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum* the fungus causing wheat scab. *Proc Nat Acad Sci USA* 97:7905–7910

O'Donnell K, Ward T J, Geiser D M, Kistler HC, Aoki T (2004) Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet Biol* 41:600-623

O'Donnell K, Ward TJ, Aberra D, Kistler HC, Aoki T, Orwig N, Kimura M, Bjornstad A, Klemsdal SS (2008) Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genet Biol* 45:1514–1522



Orole OO, Adejumo OT (2009) Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African J Microbiol Res* 3:969–973

Ownley HB, Gwinn DK, Vega EF (2010) Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* 55:113–128

Pan JH, Jones EBG, She ZG, Pang JY, Lin YC (2008) Review of bioactive compounds from fungi in the South China Sea. *Bot Mar* 51:179-190

Pažoutová S (2009) Genetic variation of *Phoma sorghina* isolates from Southern Africa and Texas. *Folia Microbiol* 54:217–229

Peet RK (1974) The measurement of species diversity. *Annu Rev Ecol Syst* 5:285-307

Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L, Timmer LW (2004) Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia* 96(1):119-134

Petrini O (1986) Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema N J, Heuvel J Van Den (ed) *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 175-187

Pinto LSRC, Azevedo JL, Pereira JO, Vierira MLC, Labate CA (2000) Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytol* 147:609–615

Pinto NFJA, Vargas EA, Preis RA (2007) Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. *Summa Phytopathol* 33(3):304-306

Posada F, Vega FE (2005) Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia* 97:1195–1200

Pronczuk M, Pronczuk S, Messyasz M (1991) Pathogenicity of *Fusarium* sp. contributing to the stalk rot of maize in Poland. *Mycotoxin Res* 7:97–101

Reis EM, Casa RT, Bresolim ACR (2004) Manual de diagnose e controle de doenças

de milho. Graphel, Lages

Rodrigues AAC, Menezes M (2005) Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. *Mycopathologia* 159:79–85

Sampietro DA, Díaz CG, Gonzalez V, Vattuone MA, Ploper LD, Catalan CAN, Ward TJ (2011) Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *Int J Food Microbiol* 145(1):359-364

Schubert K, Greslebin A, Groenewald JZ, Crous PW (2009) New foliicolous species of *Cladosporium* from South America. *Persoonia* 22:111–122

Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Res* 109:661–686

Scott PM (2001) Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *J AOAC Int* 84(6):1809–1817

Seifert K (1996) *Fusarium* Interactive Key. Agriculture and Agri-Food Canada. <http://resagrca/brd/fusarium/home1.html>. Accessed 12 December 2010

Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana

Shurtleff MC (1980) Compendium of corn diseases. American Phytopathological Society Press, St Paul

Sieber T (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol Rev* 21:75–89

Simpson EH (1949) Measurement of species diversity. *Nature* 163:688

Starkey DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM, Suga H, Toth B, Varga J, O'Donnell K (2007) Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genet Biol* 44:1191–1204

Sukumaran J, Holder MT (2010) DendroPy: A Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics* 26:1569-1571

Sun X, Guo LD, Hyde K D (2011) Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Divers* 47(1):85-95

Tanaka MAS, Maeda JA, Plazas IHAZ (2001) Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. *Sc Agri* 58:501-508

Ting ASY, Meon S, Kadir J, Radu S, Singh G (2008) Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *Biocontrol* 53:541–553

Van Rensburg JCJ, Lamprecht SC, Groenewald JZ, Castlebury LA, Crous PW (2006) Characterisation of *Phomopsis* sp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Stud Mycol* 55:65-74

Watanabe T (2002) Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press, Boca Raton

Watson SA, Ramstad PE (1987) Corn: chemistry and technology. American Association of Cereal Chemist, St Paul

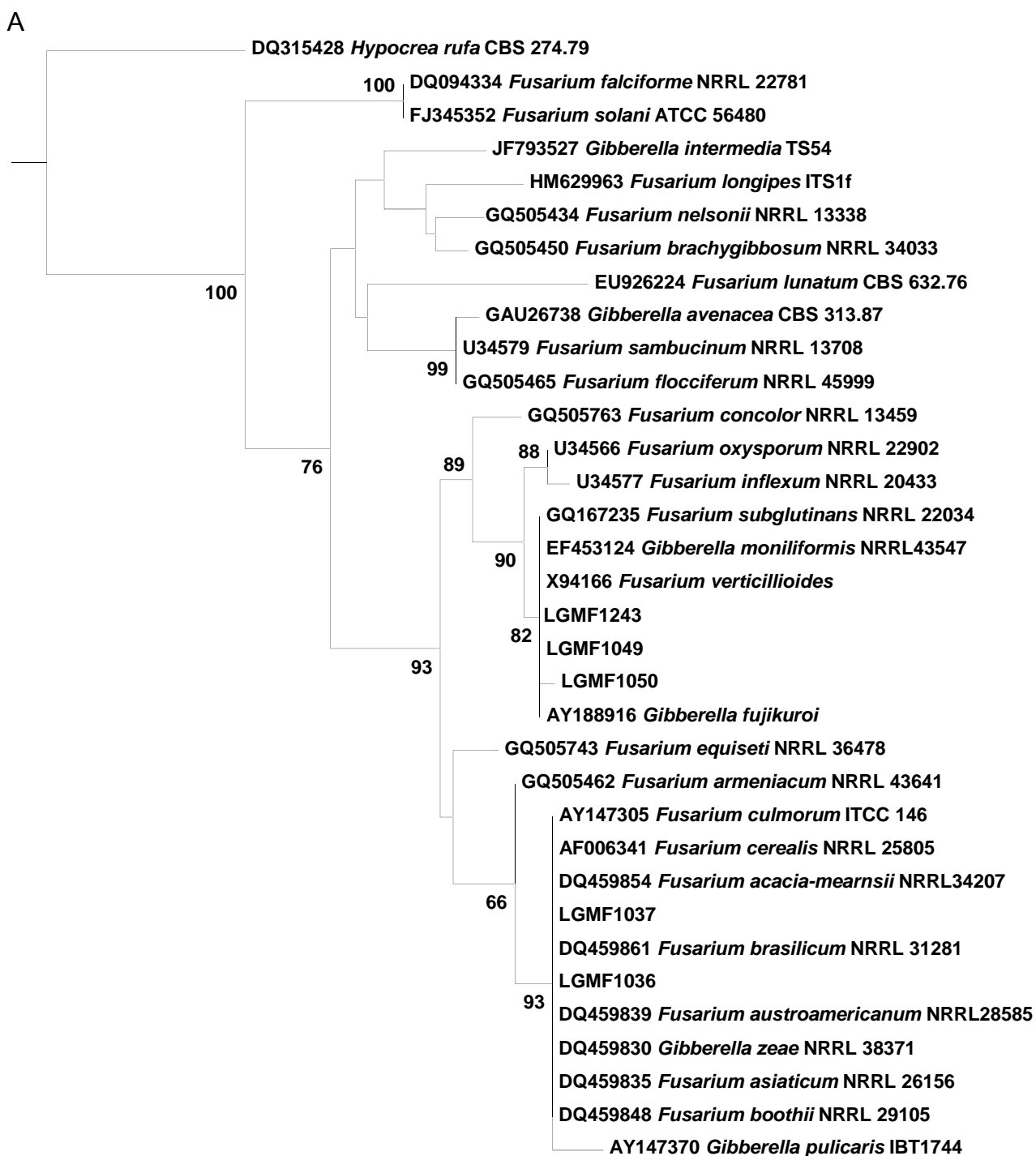
White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PC protocols: a guide to methods and applications*. Academic San Diego Press, New York, pp 315–322

Yuan ZL, Zhang CL, Lin FC, Kubicek CP (2010) Identity diversity and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in rare wild rice roots (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan China. *Appl Environ Microbiol* 76:1642-1652

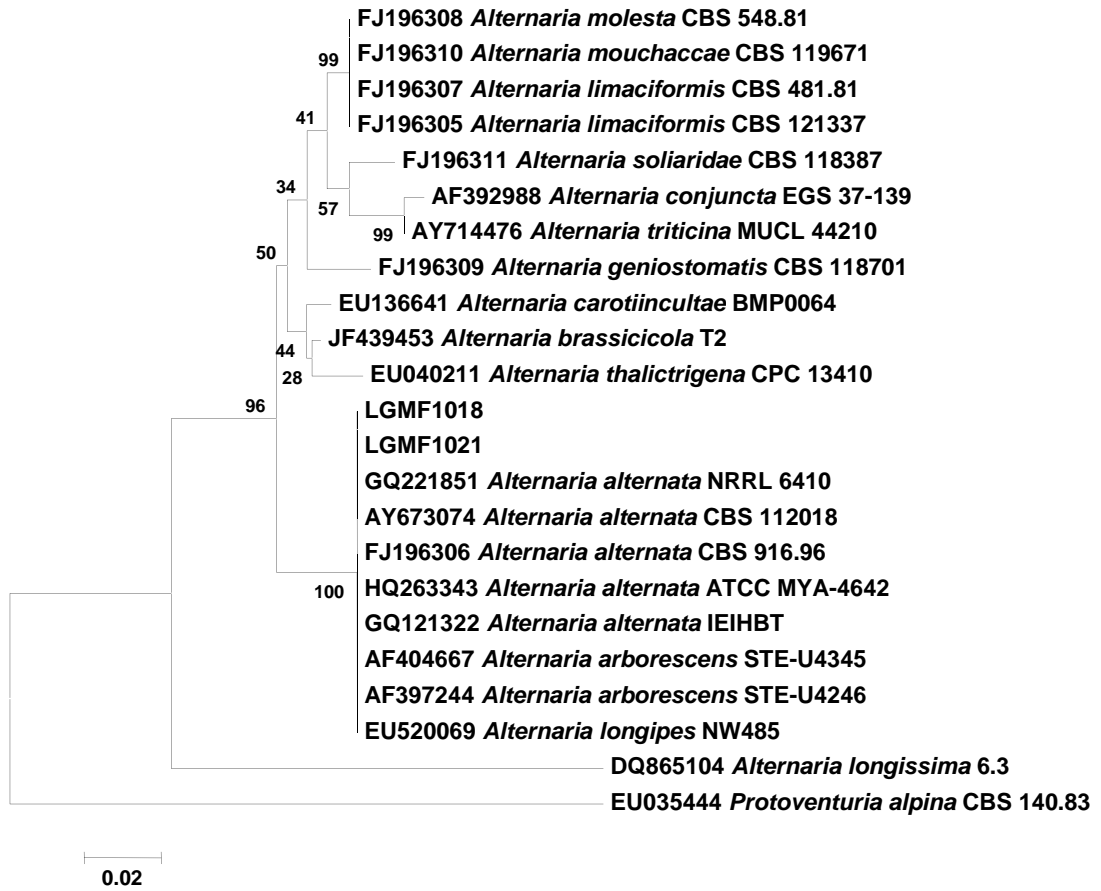
Yli-Mattila T, Gagkaeva T, Ward TJ, Aoki T, Kistler HC, O'Donnell K (2009) A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia* 101:841–852

Zwickl DJ (2006) Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. PhD dissertation, The University of Texas at Austin

Fig. 1 Árvores filogenéticas, baseadas na região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA a partir das sequências dos isolados deste estudo e espécies referência obtidos no banco de dados do NCBI. Dados gerados por Máxima Verossimilhança, com repetições de 1.000 bootstrap. (A) Gênero *Fusarium*, (B) *Alternaria* e (C) *Bipolaris*. Suportes de ramo menores que 50% não foram mostrados.



B



C

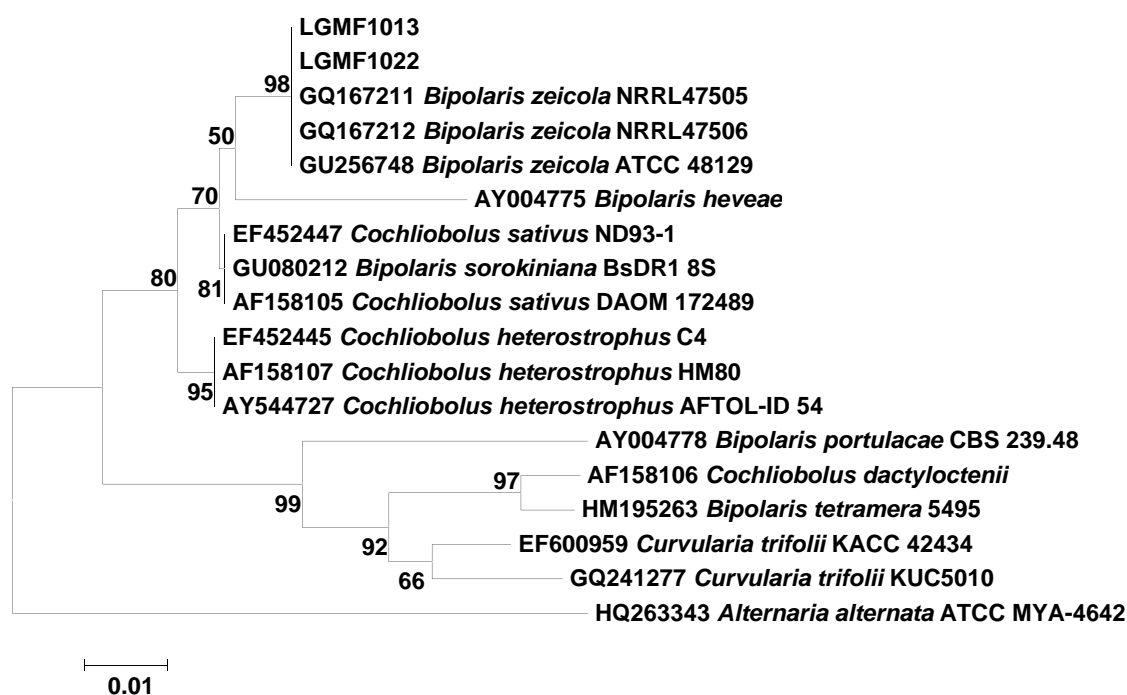
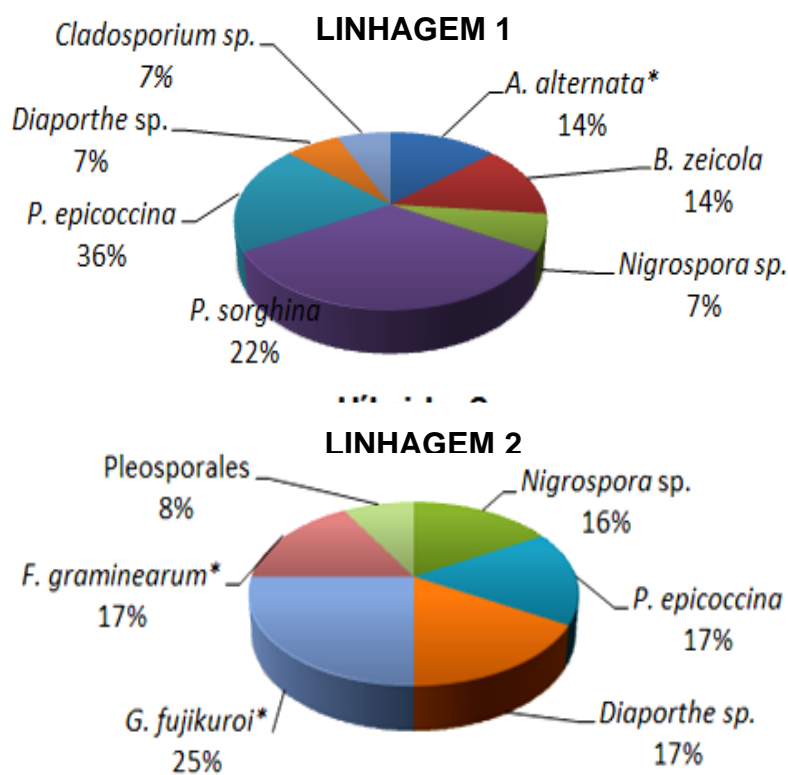


Fig. 2 Distribuição percentual da diversidade dos grupos de fungos, por linhagem de milho.



(\*) Grupos de complexos de espécies.

Tabela1 Descrição morfológica dos isolados do presente estudo e percentual de similaridade com espécies referência. (L1) Linhagem 1 e (L2) Linhagem 2.

Isolado	Híbrido	Características morfológicas	Espécie mais relacionada		
			Espécie referência	Nº acesso	Tamanho e (%) similaridade
LGMF1013	H1	Colônia cotonosa, frente e verso verde oliva. Hifa septada e conídio elipsóide. 5-8 septos transversais e hilo.	<i>Bipolaria zeicola</i> ATCC 48129	GU256748	525/525 (100)
LGMF1014	H1	Colônia flocosa cinza com pontos brancos, verso marrom. Hifas septadas e picnídio multiseptado hialino.	<i>E. nigrum</i> CBS 115825	FJ426998.1	469/464 (99)
LGMF1015	H1	Colônia densa cinza com pontos alaranjados, verso amarelo. Hifas septadas e picnídios multiseptado hialino.	<i>P. sorghina</i> PD 88/549	FJ427078.1	476/479 (99)
LGMF1016	H1	Colônia flocosa cinza e verde, verso alaranjado. Hifas septadas e picnídio multiseptado hialino.	<i>E. nigrum</i> CBS 115825	FJ426998.1	485/490 (99)
LGMF1017	H1	Colônia lanosa cinza escuro, verso cinza. Hifa septada e conídios simples, terminal, globoso hialino.	<i>N. oryzae</i> NRRL 54030	GQ28855.1	463/478 (97)
LGMF1018	H1	Colônia flocosa cinza e branca, verso preto. Hifa septada e conídio com septos longitudinais e transversais.	<i>A. albimata</i> ATCC MYA-4642	HQ263343.1	544/544 (100)
LGMF1019	H1	Colônia flocosa cinza e branca, verso amarelo. Conídio arredondado hialino.	<i>E. nigrum</i> CBS 115825	FJ426998.1	476/477 (99)
LGMF1020	H1	Colônia aveludada, marrom esverdeada, verso preto. Hifa septada e conídio ovóide com hilo.	<i>C. cladosporoides</i> CPC 12762	HM148030.1	540/540 (100)
LGMF1021	H1	Colônia densa cinza e branca, verso marrom com círculos concêntricos. Hifa septada e conídio com septos longitudinais e transversais.	<i>A. albimata</i> ATCC MYA-4642	HQ263343.1	537/538 (99)
LGMF1022	H1	Colônia cotonosa, frente e verso verde oliva. Hifa septada e conídio elipsóide. 5-8 septos transversais e hilo.	<i>Bipolaria zeicola</i> ATCC 48129	GU256748	541/541 (100)
LGMF1023	H1	Colônia aveludada frente e verso verde oliva. Hifas septadas clamidísporo simples, conídios cilíndricos e picnídios multiseptados hialino.	<i>P. sorghina</i> PD 88/549	FJ427078.1	476/479 (99)
LGMF1024	H1	Colônia flocosa cinza e verde, verso alaranjado. Hifas septadas. Hifas septadas e picnídio multiseptado.	<i>E. nigrum</i> CBS 115825	FJ426998.1	423/427 (99)
LGMF1025	H1	Colônia flocosa branca, verso amarelo. Hifas septadas e picnídio multiseptado.	<i>E. nigrum</i> CBS 115825	FJ426998.1	487/489 (99)
LGMF1026	H1	Colônia granulosa, frente e verso branca. Hifas septada e conídios do tipo beta.	<i>D. atarvii</i> 699518	FJ889448.1	423/441 (96)
LGMF1051	H1	Colônia submersa aveludada preta ramificada. Hifa septada. Picnídio multiseptado hialino e conídios ovais.	<i>P. sorghina</i> PD 88/549	FJ427078.1	443/461 (96)
LGMF1036	H2	Colônia densa cotonosa, branca com verso vermelho. Hifa septada e clamidísporos globosos em cadeia.	<i>G. zaei</i> NRRL38371 <i>F. brasiliicum</i> NRRL31281	DQ469830.1 DQ469861.1	456/456 (100)
LGMF1037	H2	Colônia densa e cotonosa, branca com verso amarelo. Hifa septada e clamidísporos globosos em cadeia.	<i>G. zaei</i> NRRL38371 <i>F. boothii</i> NRRL29105	DQ469830.1 DQ469848.1	514/514 (100)
LGMF1038	H2	Colônia lanosa cinza, verso branco. Hifa septada e conídios simples, terminal, globosa hialino.	<i>N. oryzae</i> NRRL 54030	GQ28855.1	458/457 (97)
LGMF1039	H2	Colônia lanosa cinza, verso branco. Hifa septada e conídios simples, terminal, globoso hialino.	<i>N. oryzae</i> NRRL 54030	GQ28855.1	501/529 (96)
LGMF1040	H2	Colônia granulosa, frente amarela claro e verso amarelo escuro. Hifas septada.	<i>P. camptothecae</i> 280481	AY622996.1	529/538 (98)
LGMF1041	H2	Colônia submersa cotonosa com bordas irregulares inicialmente clara e depois verde escura. Verso verde claro.	<i>O. frigidarii</i> CBS 103.81 <i>O. alatum</i> CBS 146.33	EU040234.1 EU040233.1	417/444 (94)
LGMF1042	H2	Colônia flocosa cinza amarelada, verso alaranjado. Hifas septadas e picnídios multiseptado.	<i>E. nigrum</i> CBS 115825	FJ426998.1	458/466 (98)
LGMF1043	H2	Colônia flocosa cinza amarelada, verso alaranjado. Hifas septadas e picnídios multiseptado hialino e clamidísporos simples.	<i>E. nigrum</i> CBS 115825	FJ426998.1	438/443 (99)
LGMF1049	H2	Colônia cotonosa branca, verso rosa com periferia clara. Hifa septada e microconídio cilíndrico abundante.	<i>F. verticillioidea</i> 7600	X94166.1	472/472 (100)
LGMF1050	H2	Colônia cotonosa branca, verso amarelo e centro rosa. Hifa septada e microconídio oval abundante.	<i>F. verticillioidea</i> 7600	X94166.1	423/423 (100)
LGMF1243	H2	Colônia cotonosa branca, verso rosa com periferia clara. Hifa septada e microconídio cilíndrico abundante.	<i>F. verticillioidea</i> 7600	X94166.1	476/476 (100)
LGMF1245	H2	Colônia granulosa, frente e verso branca. Hifas septada e conídios do tipo beta.	<i>P. chimonanthi</i> 280478 <i>P. michaelis</i> 280249	AY622993 AY620820	513/528 (97)

## 6 DISCUSSÃO GERAL

Bactérias endofíticas isoladas de raízes de milho constituem uma fonte promissora de recursos biotecnológicos. Para tanto, faz-se necessário identificá-las. O sequenciamento do gene 16S do rRNA tem cumprido essa finalidade conforme corroborado tanto por dados de literatura (RATÓN *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011; BENEDUZZI *et al.*, 2008) como os apresentados neste estudo. Foi possível atingir a classificação ao nível de gênero para todos os isolados bacterianos e, por meio da caracterização bioquímica, constatar possíveis propriedades associadas à promoção do crescimento vegetal que favorece a seleção dos endófitos. Ainda, sideróforos, enzimas líticas, proteases, amilases, pectinases e urease também puderam ser detectadas nos isolados deste trabalho e tem sido descritas como características desejáveis a bactérias capazes de promover o crescimento vegetal (TIAN *et al.*, 2009; PEREIRA; CASTRO, 2010; KIM;CHUNG, 2004; PAL *et al.*, 2001).

Uma outra propriedade dos endófitos bacterianos, é o seu potencial inibitório de fungos, normalmente testado *in vitro*. Esta técnica, usada com frequência, vem apresentando vantagens quando se trata de uma alta gama de indivíduos considerados. A reunião de características bioquímicas para promoção do crescimento vegetal direto ou indireto é importante, entretanto, a compatibilidade destas cepas com a planta é igualmente significativa. Neste contexto a germinação assume importante papel, pois é decisiva para os estágios subseqüentes de desenvolvimento vegetal (CASSÁN *et al.*, 2009; MEHTA *et al.*, 2010).

As folhas de milho investigadas são portadoras de fungos que foram identificados por filogenia molecular, usando o seqüenciamento da região ITS do rDNA. Foi possível classificar ao nível de espécie alguns grupos, demonstrando uma grande diversidade genética co-habitando o mesmo tecido. Estes pertencem a diferentes grupos de relação ecológica com o hospedeiro, sendo de espécies ou complexos de espécies reconhecidamente patogênicos, micotóxicos ou saprófitas. Como a distinção entre fungos endofíticos ou patogênicos é tênue (AZEVEDO *et al.*, 2000) e está associada às condições



ambientais(ARNOLD; HERRE, 2003), ao genótipo do hospedeiro, comunidade microbiana existente (PAN *et al.*, 2008) e ao próprio ciclo de vida do fungo (AGRIOS, 2005), fica então a definição da relação de cada fungo com o hospedeiro vinculada ao momento do seu isolamento. Isto não exclui a possibilidade de que, os fungos pertencentes a espécies patogênicas descritas na literatura, não venham a provocar seus sintomas na planta, no momento em que as condições forem oportunas. Fungos de espécies micotóxicas, patogênicos ou não, presentes no tecido foliar poderão por transferência horizontal, ou por dispersão de estruturas reprodutivas no ambiente, atingir os grãos e contaminar sua principal fonte de produtos e derivados do milho. Certas micotoxinas resistem até mesmo a processos de industrialização(VISCONTI; DOKO, 1994), sendo assim consumidas e provocando desordens à saúde (BILLS *et al.*, 1992; SCOTT, 2001; PINTO *et al.*, 2007). Como toda a planta toda pode ser usada para ração animal, entra nesta mesma implicação sanitária acima descrita.

A produção de micotoxinas não está necessariamente associada à manifestação de doenças no milho, mas somente pela sua condição de endofitismo pode representar um risco potencial à sua utilização (BACON; NELSON, 1994; THIEL *et al.*,1991). A identificação de fungos na planta é por si só, de alto valor agregado à manutenção das condições fitossanitárias exigidas para o consumo do milho. Portanto, esforços que venham a direcionar ações para o entendimento da dinâmica fúngica ou monitoramento de espécies que oferecem risco potencial à cultura são fundamentais na redução das perdas decorrentes dos ataques fitopatogênicos e micotóxicos.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

- Espécimes de *Bacilluse Enterobacter* isolados de raízes de milho foram capazes de promover o crescimento vegetal, com incrementos de volume radicular e aumentos no percentual de germinação.
- *Bacillus* sp. inibiram *in vitro* o crescimento de fungos de espécies fitopatogênicas ao milho, sendo elas *C. zea-maydis*, *C. graminicola*, *Bipolaris maydis* e *F. verticillioides*, por meio de antagonismo direto.
- Fungos de espécies saprófitas, micotóxicas e fitopatogênicas foram encontradas co-habitando o tecido foliar de milho sem causar lesão aparente.
- As duas linhagens de milho apresentaram colonização por fungos de maneira diferencial em relação à abundância e riqueza de espécies.

## 8 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, fifth ed. Elsevier Academic Press, London. 2005.
- ANDREW, M.; PEEVER, T.L.; PRYOR B.M. An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the smallspored *Alternaria* species complex. **Mycologia** n.101, v.1, p.95–109, 2009.
- ARAÚJO, W.; TAKISHITA, S. Micotoxinas presentes nas dietas de animais monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.4, n.2, p.405-435, 2007.
- ARNOLD, A.E.; HERRE, E.A.; Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v.95, p.388–398, 2003.
- ASHRAF, M.A.; RASOOL, MIRZA, S.M. Nitrogen Fixation and Indole Acetic Acid Production Potential of Bacteria Isolated from Rhizosphere of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advances in Biological Research**, v.5, n.6, p.348-355, 2011.
- ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v.45, p.3-15, 2004.
- AZEVEDO, J.L.; JÚNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, v.3, n.1, p. 40-65, 2000.
- BACON, C.W.; NELSON, P.E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v.57, n.6, p.514-521, 1994.
- BARRA, V.R.; ROMEIRO, R.S.; FERRAZ, H.G.M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H.S.A.; MOURA, A.B.; HALFELD-VIEIRA, B. A; MENDONÇA, H.L.; VIEIRA JÚNIOR, J.R. Potencialidade antagonística em alguns procariontes agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.121-126, 2008.
- BARRETO, E.S.; TORRES, A.R.; BARRETO, R.M.; VASCONCELOS, A.T.R.; ASTOLFI-FILHO, S.; HUNGRIA, M. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.783–790, 2008.
- BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Annual Review of Microbiology**, n.22, p.87-109. 1968.
- BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. **BMC Microbiology**, v.10, n.189, p.1-9,

2010. DOI:10.1186/1471-2180-10-189.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L.K.; BODANESE–ZANETTINI, M.H.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen–fixing Bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.311–320, 2008.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: “Uma resposta dos microorganismos”. **Química Nova**, v.25, n.6, p.1155-1164, 2002.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J.Z.; DIJKSTERHUIS, J.; STARINK-WILLEMSE, M.; ANDERSEN, B.; SUMMERELL, B.A.; SHIN, H-D.; DUGAN, F.M.; SCHROERS, H-J.; BRAUN, U.; CROUS, P.W. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). **Stud Mycol** , v.67, p.1–94, 2010.

BERNARDES, F.S.; PATRÍCIO, F.R.A.; SANTOS, A.S.; FREITAS, S.S. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.115-121, 2010.

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCÍA, A.; FILHO-CELSO, J. R.; PRIOLI, A. J.; PAMPHILE, J. A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research**, v.43, n.4, p.375-384, 2010.

BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.225-231, 2000.

BHAGAT, J.; KAUR, A.; SHARMA, M.; SAXENA ,A.K.; CHADHA B.S. Molecular and functional characterization of endophytic fungi from traditional medicinal plants. **World J Microbiol Biotechnol** , 2011. DOI: 10.1007/s11274-011-0894-0.

BILLS, G.F.; GIACOBRE, R.A.; LEE, S.H.; PELAEZ, F.; TKACZ, J.S. Tremorgenic mycotoxins, paspalitrem A and C, from a tropical *Phomopsis*. **Mycological Research**, v.96, n.11, p.977-983, 1992.

BOBATO, A. **Índice Nutricional do Nitrogênio: uma ferramenta para o diagnóstico do estado nutricional da cultura do milho**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/7482>>. Acesso em: 21/8/2008.

BONO, J.; RODRIGUES, A.; MAUAD, M.;ALBUQUERQUE, J.; YAMAMOTO, C.;CHERMOUTH, K.; FREITAS, M. Modo de aplicação de fertilizantes nitrogenados na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Agrarian**, v.1, n.2, p.91-102, 2008.

BUÉE, M.; REICH, M.; MURAT, C.; MORIN, E.; NILSSON, R.; UROZ, S.;

MARTIN, F. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, v.2, p.449-456, 2009.

CHERIF, M.; BENHAMOU, N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. **Phytopathology**, v.80, n.1406-1414, 1990.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira, Grãos, primeiro levantamento, outubro 2011.** Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_10\\_11\\_14\\_19\\_05\\_bol\\_bole\\_outubro-2011.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_10_11_14_19_05_bol_bole_outubro-2011.pdf)>. Acesso em: 10/2/2012.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos: safra 2009/2010: quarto levantamento: janeiro/2010.** Brasília, 2009. 39 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/04\\_levantamento\\_jan2010.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/04_levantamento_jan2010.pdf)>. Acesso em: 10/12/2009.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho (2004) *In*: Galvão, J.C.C., Miranda, G.V. (eds.) **Tecnologias de produção do Milho**. 20.ed. Viçosa:UFV, p. 139-82.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; BLUM, M.M.C. **Quantificação de danos causados por doenças em milho.** Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/workshop/Resumos/MilhoDanosEpidemiologia.pdf>>. Acesso em: 21/7/2010.

CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.12–19, 2009.

CHAGAS JUNIOR, A.F.; OLIVEIRA, L.A.; OLIVEIRA, A.N.; WILLERDING, A.L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 2, p.359-366, 2010.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biologicals Control of Plant Pathogens**, St. Paul, APS Press, 1989.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.4951-4959, 2005.

COSTA, R.V.; COTA, L.V. Controle químico de doenças na cultura do milho: aspectos a serem considerados na tomada de decisão sobre aplicação. Embrapa Milho e Sorgo, **Circular Técnica**, Sete Lagoas, n.125, p.1-11, 2009.

COSTA, R.V.; SILVA, D.D; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C.R..Incidence of *Colletotrichum graminicola* in stalk from maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.122-128, 2010.

DEEPA, C.K.; DASTAGER, S.G.; PANDEY, A. Plant growth-promoting activity in newly isolated *Bacillus thioeparus* (NII-0902) from Western ghat forest, India. **World J Microbiol Biotechnol**, v.26, n.12, p.2277-2283, DOI: 10.1007/s11274-010-0418-3

DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.

DUARTE, J.O. *et al.* **Economia da produção**. In: CRUZ, J. C. (Ed.). Cultivo do milho. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção). Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_3ed/economia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/economia.htm)> Acesso em: 16/7/2010.

DURÃES, F.O.M.; MAGALHÃES, P.C.; MARRIEL, I.E.; GAMAS, E.E.G.; CASELA, C.R.; OLIVEIRA, A.C.; CANTÃO, F.R. Caracterização de genótipos para uso e eficiência de nitrogênio em milho e influência da adubação nitrogenada sobre a incidência e severidade da mancha foliar de *Phaeosphaeria maydis*. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS. **Circular Técnica**, 53, 2004.

EADY, R.R. The Mo-, V-, and Fe- based nitrogenase systems of *Azotobacter*. **Advances in Inorganic Chemistry**, v.36, p.77-102, 1991.

EKUNDAYO, E.A.; ADETUYI, F.C.; EKUNDAYO, F.O. *In vitro* antifungal activities of bacteria associated with maize husks and cobs. **Research Journal of Microbiology**, v.6, n.4, p.418-424, 2011.

FARR, D.F.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A. Y., Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. **Mycologia**, v. 94, n. 3, p. 494- 504, 2002.

FEGAN, M.; MANNERS, J. M; MACLEAN, D. J.; IRWIN; J. A. G.; SAMUELS, D.; HOLDOM, G.; LI, D. P. Random amplified polymorphic DNA markes reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 2075–2081,1993.

FERNANDES, F.T.; BALMER, E. Situação das doenças de milho no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n.165, p.35-37. 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). JEDFA – Fifty-sixth meeting, Geneva, 6-15 February 2001. Disponível em:<<http://www.fao.org/>> Acesso em: 10 julho 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT – Forestry 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> Acesso em 13 jul. 2010.

FERREIRA, C.R.R.P.T.; VEGRO, C.L.R.; CAMARGO, M.L.B. Defensivos Agrícolas: desempenho recorde em 2010 e expectativas de aumento nas vendas em 2011. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v.6, n.8, 2011. Disponível em <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/AIA/AIA-30-2011.pdf>> Acesso em: 20/08/2011.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Embrapa Agroindústria Tropical, **Documentos** 110, 48 p. 2007.

FÜRNKRANZ, M.; MUELLER, H.; BERG, G. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. **Journal of Plant Diseases and Plant Protection**, v.4, n.6, p.149-155, 2009.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, p. 113-118, 1993.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.733-739, 2005.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester, John Wiley, 2000.

GÜTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v.142, p.3-16, 1996.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997. In: SHIOMI, H.F. Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras do crescimento de plantas de milho (*Zeamays* L.) Tese (Doutorado em Agronomia, Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2007.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey, Prentice Hall, 2002.

HARRIS, J.K.; KELLEY, S.T.; SPIEGELMAN, G.B.; PACE, N.R. The genetic core of the universal ancestor. **Genome Research**, v.13, p.407-412, 2003.

HARRISON, L.R.; COLVIN, B.N.; GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E.; COLE, R.J. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n.2, p.217-221, 1990.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B.S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.09, p.4431-40, 2002

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, A.; HEYDRICH-PEREZ M.; ACEBO-GUERRERO Y.; VELAZQUEZ-DEL VALLE M.G.; HERNANDEZ-LAUZARDO A.N. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. In maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v.39, n.2, p.180–186, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: **EMBRAPA Soja**, p.15-17, 2007.

HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KAPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin Detoxication of Animal Feed by Different Adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 179–188, 2001.

JUMPPONEN, A.; JONES, K. Massively parallel 454-sequencing of *Quercus macrocarpa* phyllosphere fungal communities indicates reduced richness and diversity in urban environments. **New Phytologist**, v.184, p.438-448, 2009.

KELLERMAN, T.S.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A.; CAWOOD, M.; COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. **Journal of Veterinary Research**, n.57, p.269-275, 1990.

KIM, P.I.; CHUNG, K.C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters** n.234, v.1, p.177–183, 2004.

KUBICEK, C.P. The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology** v.45, p.1-27, 1992.

KUCEY, R.M.N. Effect of *Penicillium bilagi* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. **Canadian Journal of Soil Science**, v.68, p.261-270, 1988.

KUSKE, C. R.; BARNES, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.09, p.3614-3621, 1997.



KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1459-1465, 2007.

LAMPRECHT, S.C.; CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; TEWOLDEMEDHIN, Y.T.; MARASAS, W.F.O. Diaporthaceae associated with root and crown rot of maize. **International Mycological Association Fungus**, v.2, n.1, p.13–24, 2011.

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

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.4, p.1-50, 1996.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba, Potafos, 1997.

MARTIN, K.; MCDUGALL, B.M.; MCILROY, S.; JAYU S.; CHEN, J.; SERVIOUR, R.J. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal  $\alpha$ -(1,3)- and  $\alpha$ -(1,6)-glucanases. **FEMS Microbiology Reviews** v.31, p.168-192, 2007.

MATSON, P.A.; NAYLOR, R.; MONASTEIRO, O. Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. **Science**, v.280, n.3, 1998.

MEDEIROS, M.; BARBOSA, A.S.; MELO, A.S.; LEITE, J.U.; LIRA, W.B.; LACERDA, P.B. **Processo de transição agroecológica: o uso de biofertilizantes líquidos no manejo de pragas agrícolas**. In: III JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 2008, Bananeiras-PB. III JORNADA NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA. João Pessoa-PB: UFPB, 2008. Disponível em: <[http://www.seminagro.com.br/trabalhos\\_publicados/3jornada/01producao\\_agropecuaria/PA0101.pdf](http://www.seminagro.com.br/trabalhos_publicados/3jornada/01producao_agropecuaria/PA0101.pdf)>. Acesso em: 13/07/2010.

MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; MAHAJAN, R.; MAHAJAN, P.K.; SHIRKOT, C.K. Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. **Current Science**, v.98, n.4, p.538–542, 2010.

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

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, p.51-65, 2006. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x.

NILSSON, R.; RYBERG, M.; KRISTIANSSON, E.; ABARENKOV, K.; LARSSON, K.; KOLJALG, U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. **PLoS One**, v.1, n.1, p.59, 2006. DOI:10.1371/journal.pone.0000059.

NILSSON, R.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K.; SJÖKVIST, E.; KRISTIANSSON, E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. **FEMS Microbiology Letters**, v.296, n.97-101, 2009.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H.I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v.90, p.465–493, 1998.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; GEISER, D. M.; KISTLER, H.C.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics Biology**, v.41, p.600-623, 2004.

OLIVEIRA, V.M.; COUTINHO, H.L.C.; SOBRAL, B.W.S.; GUIMARÃES, C.T.; VAN ELSAS, J.D.; MANFLIO, G.P. Discrimination of *rhizobiumtropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.137-141, 1999.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 161, 2003.

OUATTARA, H.G.; REVERCHON, S.; NIAMKE, S.L.; NASSER, W. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. **Food Microbiology**, v.28, n.1, p.1–8, 2010.

PAL, K.K.; TILAK, K.V.B.R.; SAXENA, A.K.; DEY, R.; SINGH, C.S. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Microbiology Research**, n.155, p.233–242, 2000.

PAN, J.H.; JONES, E.B.G.; SHE, Z.G.; PANG, J.Y.; LIN, Y.C. Review of bioactive compounds from fungi in the South China Sea. **Botanica Marina**, v.51, p.179-190, 2008.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.62-77, 2002.

PEREIRA, B.A.; CASTRO-SILVA, M.A. Rizobactérias formadoras de endósporos associadas a *Tibouchina urvilleana* de áreas impactadas por rejeitos da mineração do carvão. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, n.34, p.563-567, 2010.

PEREIRA, P.; ALBANEZ, F.; ROSENBLUETH, M.; ETCHEVERRY, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **International Scholarly Research Network, Ecology**, 2011, 10p. DOI:10.5402/2011/938546.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. VAN DEN (Ed), **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge University Press, p.175-187, 1986.

PINTO, N.F.J. Cultivo doenças, qualidade sanitária dos grãos. Embrapa Milho e Sorgo, Sistemas de Produção, 1 . 2006. Versão Eletrônica - 2ª Edição Dez./2006. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_2e](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2e)> Acesso em: 26/04/2011

PINTO, N.F.J.; OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F.T. Manejo das Principais Doenças do Milho. Embrapa Milho e Sorgo, **Circular Técnica**, n.92, p.1-16, dez. 2007.

PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M. Noncellulolytic fungal glucanases: Their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.178-192, 1993.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21, p.400-407, 2003.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.254-259, 1997.

RANA, A.; SAHARAN, B.; JOSHI, M.; PRASANNA, R.; KUMAR, K.; NAIN, L. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Annals of Microbiology**, v.61, p.893-900, 2011.

RATÓN, T.M.O.; YANO, R.; GÁMEZ, O.R.; FLOH, E.I.S.; DÍAZ, M.J.S.; BARBOSA, H.R. Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World J Microbiol Biotechnol** , 2011. DOI:101007/s11274-011-0965-2.

REIS, E.M., CASA, R.T. & BRESOLIN, A.C.R. Manual de diagnose e controle de doenças do milho. 2.ed. Lages SC. Graphel. 2004.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. In: **FERNANDES, M.S.** (Ed) Nutrição Mineral de Plantas. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.153-174, 2006.

REVA, O.N.; DIXELIUS, C.; MEIJER, J.; PRIEST, F.G. Taxonomic

characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.48, p.249–259, 2004.

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M.; RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.802-808, 2007.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

ROMEIRO, R.S. **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. UFV, Cadernos didáticos, Viçosa, 1999. Disponível em: <[www.ufv.br/dfp/bac/indures.pdf](http://www.ufv.br/dfp/bac/indures.pdf)> Acesso em: 13/7/2010.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; Van ELSAS, J. D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strain and soil sample analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2770-2779, 1998.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.39-67, 2001.

SASSE, S. **Caracterização de variedades locais de milho procedentes de anchieta – S.C. quanto à resistência a *Exserohilum turcicum***. Dissertação (Mestrado em Ciências com Área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

SCHUBERT, K.; GRESLEBIN, A.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. New foliicolous species of *Cladosporium* from South America. **Persoonia**, v.22, p.111–122, 2009

SCOTT, P.M. Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. **Journal of AOAC International**, v.84, n.6, p.1809–1817, 2001.

SILVEIRA, E.L. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA**. Jaboticabal, Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 83 p., 2004.

SHARMA, V.K.; NOWAK, J. Enhancement of *Verticillium* wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.528-536, 1998.

SHIOMI, H.F. **Bioprospecção de bactérias endofíticas como agentes de biocontrole da mancha de *Exserohilum turcicum* e como promotoras do**

**crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.)**. Botucatu, 2007.184p. Tese(Doutorado em Agronomia, Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295, 2004.

SMITH, T.K.; SEDDON, I.R. Synergism Demonstrated between *Fusarium* Mycotoxins. **Feedstuffs**, v.22, p.12-16, 1998.

SONG, O.R.; LEE, S.J.; LEE, S.C.; KIM, K.K.; CHOI, Y.L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.151-156, 2008.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: **Nutrição Mineral de Plantas**. Ed. Manlio Silvestre Fernandes. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, 2006.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, v.66, p.45-54, 1988.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Review Biotechnologic**, v.22, p.315–333, 2002.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infection**, v.5, p.535–544, 2003.

SUN, X.; GUO, L.D.; HYDE, K.D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. **Fungal Diversity**, v.47, n.1, p.85-95, 2011. DOI: 10.1007/s13225-010-0086-5.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre, Artmed, 2009.

THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLOM, W. C. A.; NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p.1089-1093, 1991.

TIAN, F.; DING, Y.; ZHU, H.; YAO, L.; DU, B. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.2, p.276-284, 2009.

VALE, M.; SELDIN, L.; ARAÚJO, F.F.; LIMA, R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: MAHESHWARI, D.K. (ed). **Plant growth and health promoting bacteria**. Berlin, Springer, 2010. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2\_2.

VANDAMME, T.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, DE P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.

VAN RENSBURG, J. C. J.; LAMPRECHT, S. C.; GROENEWALD, J. Z.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W. Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. **Stud Mycol**, v.55, p.65-74, 2006.

VIÉGAS, A.P. **Alguns fungos do Brasil. Boletim Sociedade Brasileira Agronomia**, n. 8, p. 160, 1945. In: CASA, R.T.; REIS, E.M.; BLUM, M.M.C. Quantificação de danos causados por doenças em milho. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/workshop/Resumos/MilhoDanosEpidemiologia.pdf>>. Acesso em: 21/7/2010.

VISCONTI, A.; DOKO, M. B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of AOAC International**, v.77, n.2, p.546- 550, 1994.

VITERBO, A.; RAMOT, O.; CHERNIN, L.; CHET, I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. In the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.81, p.549-556, 2002.

WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPLETT, E. W. (Eds.) **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Horizon Scientific Press: Madison, p.177-186, 2000.

WANG, S.; HUIJUN, W.; JUNQING, Q.; LINGLI, M.; JUN, L.; YANFEI, X.; XUEWEN, G. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.10, p.1250–1258, 2009.

WHITE JÚNIOR, J.F.; MORROW, A.C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, v.82, p.218-226, 1990.

WOESE, C.; FOX, G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n.11, p.5088–90, 1977.

YUMBE-GUEVARA, B.E.; IMOTO, Y.T.; YOSHIZAWA, T. Effects of Heating Procedures on Deoxynivalenol, Nivalenol and Zearalenone Levels in Naturally Contaminated Barley and Wheat. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.12, p.1132 -1140, 2003.

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

ZHAN, J.; SUN, Q.Y. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in wastelands of copper mine tailings during the process of natural ecological restoration. **Journal of Environmental Sciences**, v.23, n.3, p.476–487, 2011.

ZDOR, R.E; ANDERSON, A.J. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of beans. **Bulletin-SROP**, v.14, n.8, p.187-190, 1991.

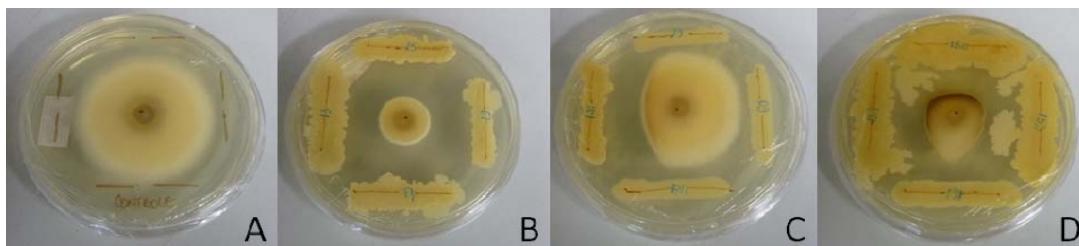
ZEILINGER, S.; OMANN, M. *Trichoderma* biocontrol: involvement of signal transduction pathways in host sensing and mycoparasitism. **Gene Regulation and Systems Biology**, v.1, p.227-234, 2007.

ZUCCHI, T.D; MELO, I.S. Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos In: Bettiol, W.; Morandi, M.A.B. (eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Ed. Jaguariuna, Jaguariúna, 2009.

## APÊNDICES

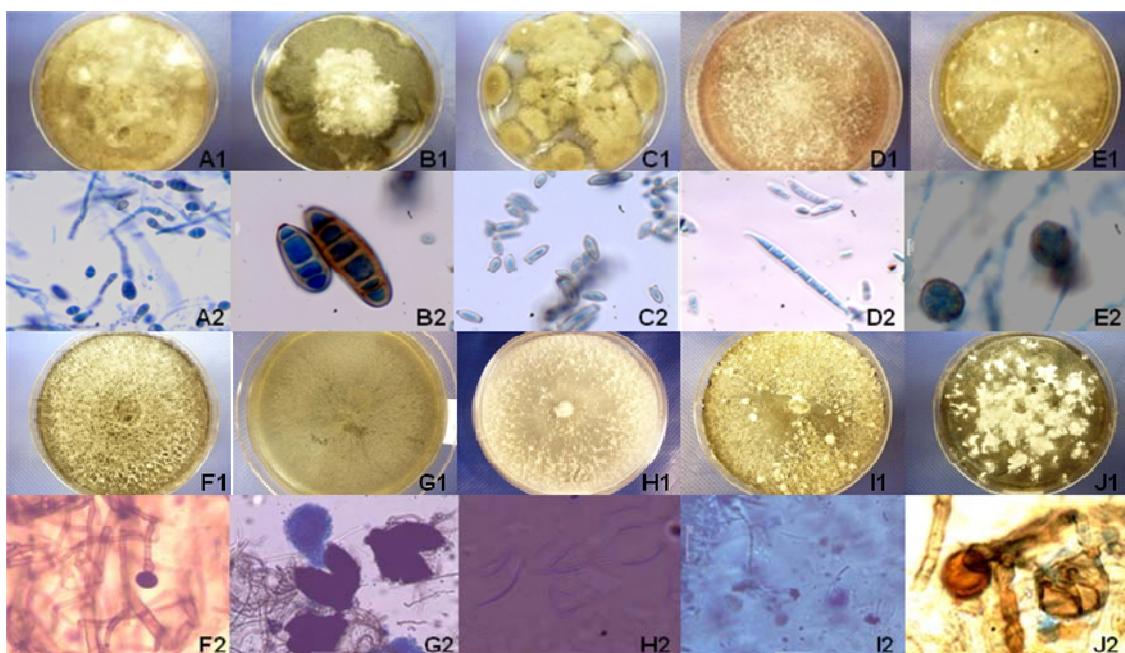


## APÊNDICE 1 - PLACAS DE ANTAGONISMO EM FASE DE ANÁLISE



Testes de antagonismo: letras A (tratamento controle), B, C e D são antagonismos por cultura pareada.

## APÊNDICE 2 - CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICRO MORFOLÓGICA FUNGICA

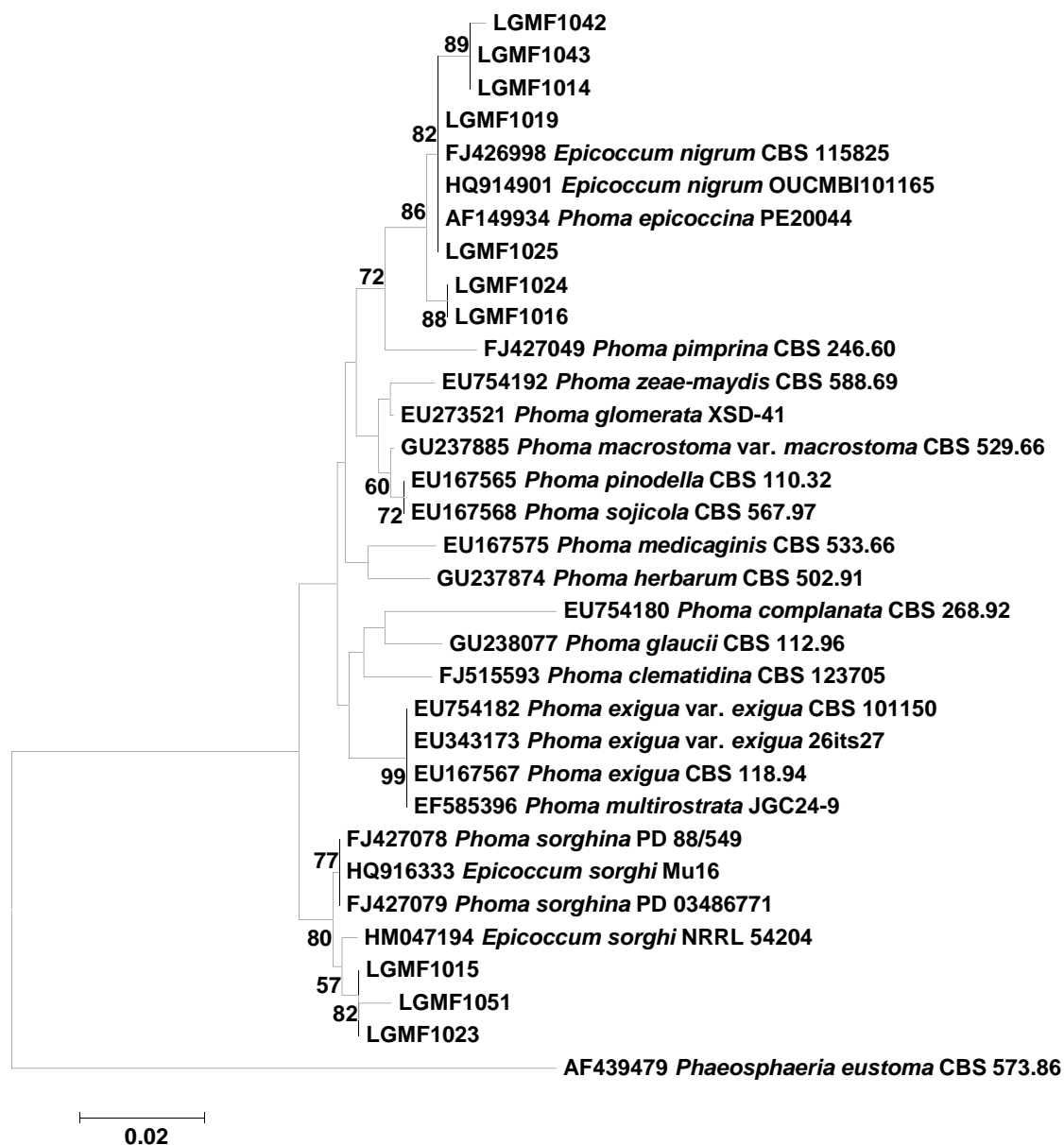


Colônia crescida em meio BDA e estrutura reprodutiva respectivamente. A1 e A2 *Alternaria* sp. (LGMF1021).; B1 e B2 *Bipolaris* sp.(LGMF1013); C1 e C2 *Cladosporium* sp.(LGMF1020); D1 e D2 *Fusarium* sp.CGF (LGMF1243); E1 e E2 – J1 e J2 *Phoma/Epicoccum* sp. (LGMF1042, LGMF1016); F1 e F2 *Nigrospora* sp. (LGMF1017); G1 e G2 *Phoma* sp. (LGMF1051); H1 e H2 *Phomospsis* sp.(LGMF1026); I1 e I2 *Phomopsis/Diaporthes* sp. (LGMF1245).

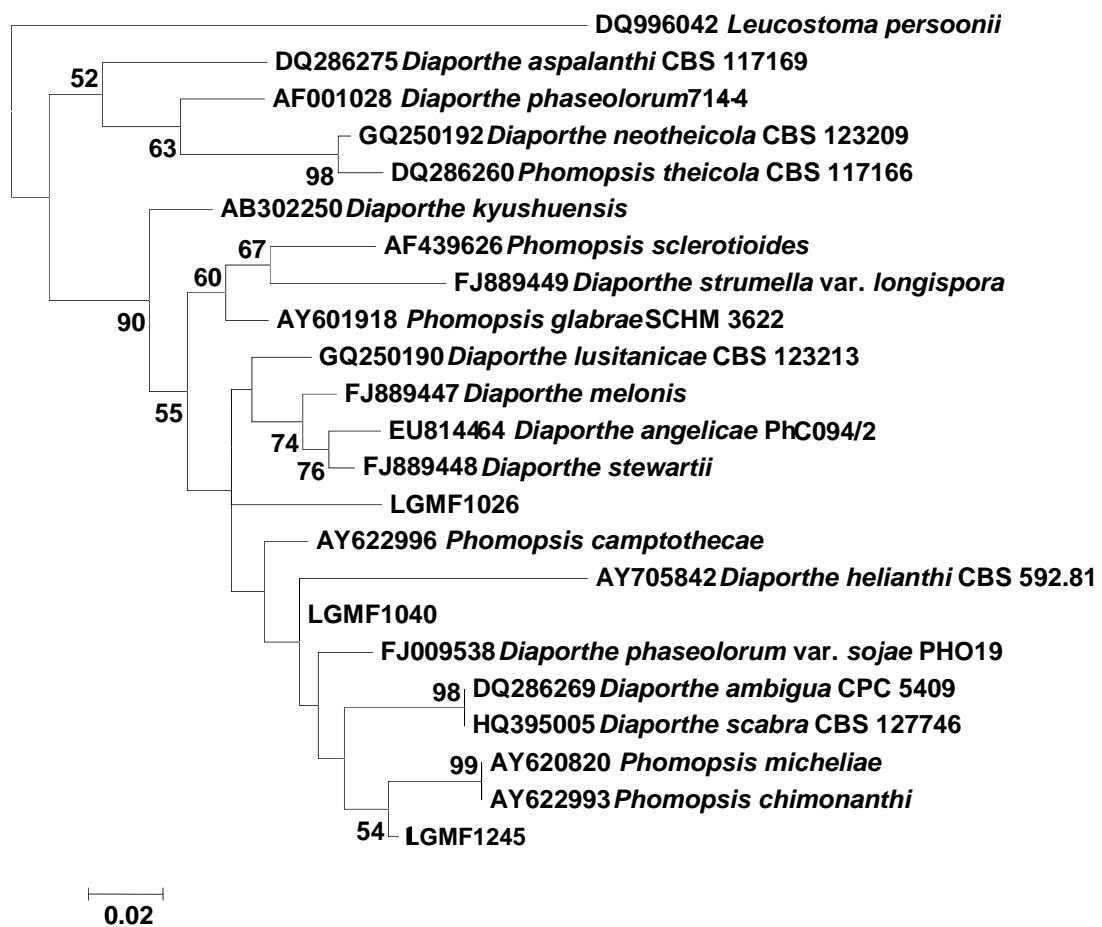
### APÊNDICE 3 - ÁRVORES FILOGENÉTICAS DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Árvores filogenéticas, baseadas na região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA a partir das sequências dos isolados deste estudo e espécies referência obtidos no banco de dados do NCBI. Dados gerados por Máxima Verossimilhança, com repetições de 1.000 bootstrap. Gêneros: (A) *Phoma*, (B) *Diaporthe* e (C) *Nigrospora*. Suportes de ramo inferiores a 50% não foram mostrados.

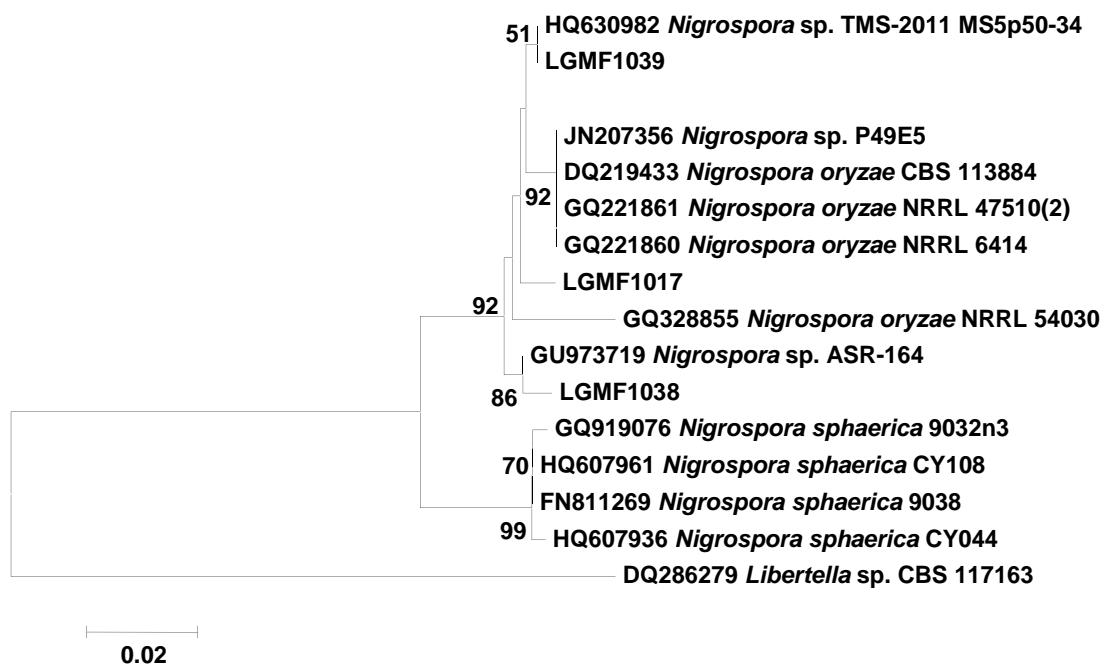
A



B



C



**ANEXOS**

## ANEXO 1 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA AMOSTRAGEM DAS FOLHAS.

BRASIL, PARANÁ, CAMPO-LARGO. 25° 27' 32" S e 49° 31' 40" O.



## ANEXO 2 - METODOLOGIA DETALHADA

### A) PREPARO DO MATERIAL

Os materiais utilizados para a realização das atividades laboratoriais foram previamente esterilizados. Meios de cultura, soluções, espátulas e palitos de transferência foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera, por 20 minutos. Vidrarias foram esterilizadas em forno Pasteur a 180° C por 4 horas.

### B) MEIOS DE CULTURA

#### MEIO ÁGAR DE BATATA E DEXTROSE (BDA)

Batata .....	200 g
Dextrose .....	20 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL
Ágar .....	15 g

pH 5,8

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada por 20 minutos em forno microondas. As

batatas foram então descartadas e ao caldo restante acrescentado a dextrose. O volume foi completado para 1000 mL, o pH ajustado para 5,8 com NaOH 1N e o ágar acrescentado diretamente aos frascos. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### MEIO SUCO-DE-TOMATE-TEMPERADO (STT) (BRUNELLI *et al.*, 2006)

Suco de tomate temperado .....	200 mL
Carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> ).....	3,2 g
Ágar .....	15 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	800 mL

O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### MEIO DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986)

Dextrose .....	2,0 g
Peptona .....	1,5 g
Extrato de levedura .....	2,0 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	0,5 g
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> ) .....	0,5g
Ácido L-glutâmico .....	1,5 g
Ágar .....	15 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL

pH 7,0

O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### MEIO MINERAL (RENEWICK *et al.*, 1991)

Carbonato de cálcio (CaCO <sub>3</sub> ) .....	0,02 g
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) .....	0,01 g
Cloreto de potássio (KCl).....	1,71 g
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) .....	0,05 g
Fosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O) .....	4,11 g

Ágar .....	15 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	1000 mL

Os itens listados foram misturados e como única fonte de carbono usou-se: para o teste de celulase, carboximetilcelulose a 0,5 % e ajustou-se o meio para o pH 5,0; para a detecção de quitinase utilizou-se quitina coloidal a 0,08 % com pH 7,0 e para  $\beta$ -1,3-glucanase foi usado laminarina a 0,5% em pH 7,0. Os meios foram autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### MEIO LEITE-DESNATADO-AGAR (BERG *et al.*, 2002)

Leite desnatado q.s.p.....	1000 mL
<i>Trypticase Soye Agar</i> (TSA) .....	6 g
Ágar .....	20 g
pH 7,0	

Aqueceu-se a 55°C o leite desnatado esterilizado e acrescentou-se o TSA em seguida o agar. O meio foi autoclavado a 121°C, 1 atm, por 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

#### MEIO UREASE (DYE, 1968) COM MODIFICAÇÕES

Fosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	0,5 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	0,5 g
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) .....	0,2 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	10 mL
Extrato de levedura .....	1 g
Azul de bromotimol a 0,5% .....	2,5 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	800 mL
pH 5,8	

Distribuiu-se 4 mL do meio em tubos de ensaio e autoclavou-os a 121°C, 1 atm, por 20 minutos, mantendo sempre os tubos na posição vertical. Para o preparo da solução de uréia, misturou-se 20 g de uréia em 180 ml de água destilada, esterilizando-a por filtração. A seguir, em condições assépticas, adicionou-se 1 ml da solução para cada tubo com 4 ml de meio.

MEIO NFb (DOBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Acido málico .....	5 g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )10%.....	5 mL
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) 10%.....	2 mL
Cloreto de sódio (NaCl) 10%.....	1 mL
Cloreto de cálcio (NaCl) 1%.....	2 mL
Extrato de levedura .....	50 mg
Azul de bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
Solução de micronutrientes.....	2 mL
EDTA de Ferro 1,64%.....	4 mL
Solução de vitaminas.....	1 mL
Hidroxido de Potássio.....	4,5 g
Ágar.....	1,5 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. ....	800 mL

O pH ajustado para 6,5,o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121oC durante 20 minutos.

### C) SOLUÇÕES E REAGENTES

SOLUCAO DE MICRONUTRIENTES (DOBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	0,235 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,28 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,008 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,024 g
Agua destilada.....	1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solucao foi autoclavada a 1 atm em temperaturade 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente

SOLUCAO DE VITAMINAS (DOBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)



Biotina.....	10 mg
Piridoxina.....	20 mg
Água destilada.....	1000 mL

#### LACTOFENOL – AZUL ALGODÃO

##### LACTOFENOL

Fenol .....	20 g
Ácido láctico .....	40 mL
Glicerina .....	40 mL
H <sub>2</sub> O destilada. ....	20 mL

##### AZUL ALGODÃO

Azul algodão .....	0,5 g
H <sub>2</sub> O destilada .....	50 mL

Devem ser misturados os quatro primeiros itens do lactofenol a 5 mL da solução de azul algodão e por último acrescentar 20 mL de ácido acético glacial.

#### TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO

Tris-HCl pH 8,0 .....	125 mMol/L
EDTA dissódico pH 8,0.....	50 mMol/L
Cloreto de sódio (NaCl) .....	2 Mol/L
SDS pH 7,2 .....	1%

##### TRIS-HCl pH 8,0 - 1 Mol/L

Dissolva 121,1g de Tris base em 800ml de água destilada ou ultrapura. Ajusta o pH adicionando HCl concentrado (37%) para 8,0 (aproximadamente, 42ml de ácido). Espere a solução esfriar e faça os ajustes finais de pH e complete o volume para 1000ml. Deve ser autoclavado e armazenado a 4°C.

##### EDTA DISSÓDICO (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> .2H<sub>2</sub>O) - 0,5 Mol/L

Dissolva 186,1g de EDTA Dissódico dihidratado em 800ml de água destilada ou ultrapura. Agite vigorosamente (ex.: agitador magnético) e adicione Hidróxido de Sódio (NaOH) em pérolas até o pH 8,0

(Aproximadamente 20g). O Sal não dissolve enquanto pH da solução não atingir 8,0. Complete o volume para 1000ml. Esterilize autoclavando e armazene em temperatura ambiente

#### SDS (DODECIL SULFATO DE SÓDIO) pH 7,2 - 20% (m/v)

Dissolva 200g de SDS em 900ml de água. Para tal, aqueça a solução até 68°C e utilize um agitador magnético em velocidade baixa, evitando espuma excessiva. Se necessário, ajuste o pH para 7,2 com o auxílio de HCl diluído. Complete o volume para 1000ml. Não autoclave e armazene em temperatura ambiente.

#### CLOROFANE

Em capela misture 1 parte de Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) com 1 parte de Fenol Saturado ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ), em seguida adicionar Tris-HCl 1M pH8,0 suficiente para cobrir a superfície da solução. Aguardar ao menos 4 horas antes do uso.

#### CLOROFIL

Em capela misture 24 partes de Clorofórmio com 1 parte de Álcool Isoamílico ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ).

#### SOLUÇÃO CAS

Solução Cromo azurol S ..... 50 mL

Solução Ferro (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ..... 10 mL

Solução de HDTMA ..... 40 mL

Dissolver 60,5 mg de Cromo azurol S em 50 ml de água destilada, misturar a 10 ml de ferro (III) ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – cloreto férrico hexaidratado a 1mM em HCl – ácido clorídrico a 10 mM), autoclavar esta solução e reservar. Dissolver 72,9 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylamonium) em 40 ml de água, autoclavar e misturar sob agitação vagarosamente à solução acima.

#### SOLUÇÃO VERMELHO CONGO

Dissolver 0,6 g/L de vermelho Congo em água destilada, não é necessário autoclavar a solução posteriormente.

### SOLUÇÃO DE ÁCIDO PÍCRICO PARA TESTE HCN

Em água destilada adicionou-se 5% de ácido pícrico ( $C_6H_3N_3O_7$ ) e 2% de carbonato de sódio ( $NaCO_3$ ).

### SOLUÇÃO DE LUGOL

Dissolveu-se 3 g de iodeto de potássio (KI) em 10 mL de água destilada. A esta solução adicionou-se 1 g de cristais de iodo. O volume da solução final foi completado para 100 mL.

### ACETATO DE AMÔNIA 7,5 M

Acetato de Amônio .....	20 g
H <sub>2</sub> O ultrapura .....	1000 mL

### DNA POLIMERASE

Utilizou-se a enzima *Taq* DNA polimerase *Platinum*, da marca Invitrogen, nas reações de amplificação, na concentração de 5U/ $\mu$ L.

### dNTPs

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dAPT, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100mM), foram diluídos em água ultra pura a 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2mM de cada dNTP.

### GEL DE AGAROSE (0.8%)

Agarose .....	0,8 g
Tampão TBE 1x .....	100 mL

### GEL DE AGAROSE (1,5%)

Agarose .....	1,5 g
Tampão TBE 1x .....	100 mL

### MARCADOR DE PESO MOLECULAR (DNA *Ladder* 100pb INVITROGEN)

O marcador de peso molecular foi diluído na proporção de: 1 $\mu$ L de marcador : 1 $\mu$ L do tampão da amostra : 4  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada, resultando em uma solução de concentração de 50ng/ $\mu$ L.

#### MARCADOR DE PESO MOLECULAR (DNA DE FAGO LAMBDA CLIVADO COM *Hind* III *Gibco*<sup>®</sup>)

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 $\mu$ L de marcador : 1 $\mu$ L do tampão da amostra : 4  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada, resultando em uma solução de concentração de 50ng/ $\mu$ L.

#### TAMPÃO DE CORRIDA TBE 10X PH 8,0

Trizma base .....	54g
Ácido Bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) .....	27,5g
EDTA .....	4,65g
H <sub>2</sub> O Milli-Q .....	p/ 500mL

A solução foi autoclavada a 1 atm e estocada em temperatura ambiente.

#### **D) CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS E BACTERIANOS**

Os isolados fúngicos e bacterianos estão sendo estocados em tubos com Ágar BDA e NA respectivamente. Para o preparo dos tubos, o meio de cultura é derretido e aproximadamente 5 mL são distribuídos em pequenos frascos de vidro que são tampados com rolha de algodão. Após esterilização destes, em autoclave por 20 minutos a 1 atm; são inclinados a temperatura ambiente em um suporte, de maneira que o meio solidifique inclinado em forma de bico de flauta (ângulo de 45°). Os fungos e bactérias são então repicados nos frascos com meio, citados anteriormente, e incubados a 28° C, entre 3 e 7 dias. Os frascos são então vedados com rolhas plásticas e armazenados em refrigerador (4°C). A cada dois meses, ou quando necessário, as linhagens são repicadas, seguindo a mesma metodologia citada acima.

Segundo o Método de Castellani, os fungos e bactérias são crescidos em meio de cultura sólido. Discos de micélio contendo meio de cultura, bem como colônias de bactérias retiradas com auxílio de uma alça foram armazenados em microtubos contendo água destilada autoclavada e mantidos

em temperatura ambiente (CASTELLANI, 1967).

## **E) EXTRAÇÃO DE DNA**

### **EXTRAÇÃO DE DNA DE LINHAGENS FÚNGICAS**

Os isolados obtidos a partir de isolamento foram semeados em placas com Agar BDA recobertas com papel celofane estéril, para permitir a retirada do micélio sem ágar. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit, MoBio®.

De acordo com o protocolo do fabricante, em torno de dois centímetros quadrados do micélio são coletados com o auxílio de uma espátula estéril e depositados em Microbead Tubes (MO BIO®) contendo 300 µL de solução Microbead (MO BIO®) e 50 µL de solução MD1 (MO BIO®). Os tubos são levados ao Banho-Maria 60°C por 5 minutos e em seguida são colocados vortex horizontal e homogeneizados em velocidade máxima por 3 minutos, repete-se este procedimento três vezes. Após este procedimento, são centrifugados por 5 segundos a 9.700 rpm. Transfere-se o sobrenadante para 2 mL Collection Tubes (MO BIO®). Adiciona-se 100 µl de solução MD2 (MO BIO®), e homogeneiza-os por 5 segundos em vortex. Os tubos são incubados por 5 minutos a 4°C (em gelo) e então centrifugados a 9.700 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente. Forma-se um pellet, e então retira-se todo o sobrenadante, que deve ser colocado em novos 2ml Collection Tubes (MO BIO®). Adiciona-se então 900µL de solução MD3 (MO BIO®). Os tubos devem ser homogeneizados em vortex por 5 segundos. Coleta-se aproximadamente 600µL da amostra e esta é transferida para Spin Filters Tubes (MO BIO®). Estes são centrifugados por 30 segundos a 9.700 rpm. Descarte-se toda a solução filtrada que se encontra no fundo do tubo, e repete-se esta etapa com o restante do volume que estava no outro tubo com solução MD3 (MO BIO®). Lava-se o filtro com 300 µL de solução MD4 (MO BIO®) e procede-se a outra centrifugação a 9.700 rpm por 30 segundos. Descarta-se o filtrado e centrifuga-se novamente por 30 segundos a 9.700 rpm, para remover qualquer resíduo da solução MD4 (MO BIO®). Retira-se os filtros, estes devem ser colocados 2 mL Collection Tubes (MO BIO®) limpos. Adiciona-se então, 50 µL de solução MD5 (MO BIO®) no centro do filtro. Aguardar 5 minutos e centrifuga-se por 30

segundos a 9.700 rpm. Este filtro deve ser descartado e o DNA estará no tubo, pronto para uso.

A quantificação e integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), com marcador de peso molecular *Hind III Gibco*<sup>®</sup>, corado com GelRed<sup>®</sup> e visualizada em luz ultravioleta e utilizando-se também o espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> 2000 (*Thermo Scientific*).

#### EXTRAÇÃO DE DNA DE LINHAGENS BACTERIANAS

O DNA genômico dos isolados bacterianos foi obtidos de acordo Raeder e Broda (1985), com modificações: as bactérias foram cultivadas por uma noite em 1mL de meio líquido Luria Bertani (LB), sob agitação em *shaker* a 120 rpm, sendo então centrifugadas por 2 min a 10.000 g. Adicionaram-se ao pellet 2 mL de tampão de extração (Tris-HCl pH 8,0 125 mMol/L; NaCl 2 Mol/L; EDTA pH 8,0 50 mMol/L e SDS pH 7,2 1%), previamente aquecido a 60°C, até que o tampão passe da cor branco turvo para a cor transparente. Colocou-se a mistura em um vortex horizontal por 5 min, seguida por incubação a 60°C por 20 min. A amostra foi transferida para gelo durante 10 min e centrifugada por mais 10 min a 10.000 g. Em capela o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, e foi adicionado o mesmo volume de clorofane [1:1 de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH)] e, novamente, centrifugado (5 min a 10.000 g). O sobrenadante foi transferido para outro microtubo cuidadosamente para não retirar junto o líquido contido na fase inferior das soluções e foi adicionado o mesmo volume de clorofil [24:1 de CHCl<sub>3</sub> e álcool isoamílico (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH)], sendo em seguida centrifugado (5 min a 10.000 g). Finalmente, o sobrenadante foi levado para outro microtubo e o mesmo volume de isopropanol foi adicionado e, a seguir, a mistura foi centrifugada (20 min a 12.000 g). A seguir, a fase aquosa foi dispensada cuidadosamente e 500 µL de etanol 70% foram adicionados, e o conteúdo foi centrifugado (10 min a 12.000 g). Novamente a fase aquosa foi dispensada e, após secaram, foram adicionados 50 µL de água ultrapura para ressuspender o DNA. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) com marcador de peso molecular *Hind III Gibco*<sup>®</sup>, corado com GelRed<sup>®</sup> e visualizada em luz ultravioleta .

## F) AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 E GENE 16S

### REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 rDNA

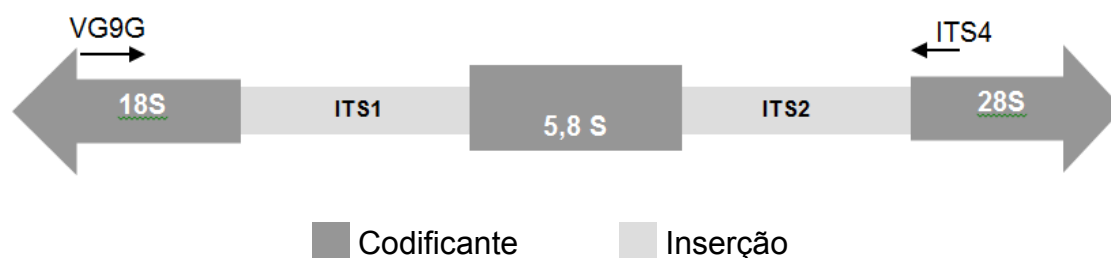
As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se os *primers* V9G e ITS4. Estes permitem a amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2; localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA do DNA ribossomal de fungos. O ITS é dividido em ITS1 que localiza-se entre os genes 18S e o 5.8S; já o ITS2 separa os genes 5.8S e 28S. Estas regiões, após a transcrição darão origem ao RNA ribossômico.

As condições de amplificação são as descritas por STRINGARI, 2009; com algumas modificações: 10 ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,5U de Taq polimerase, 0,1 µM de primers (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, e volume final de 12,5 µl. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*® (Modelo: *Mastercycler Gradient*), com desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 55° C, 1 minuto a 72° C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72° C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com GelRed® e visualizados em luz ultravioleta.

SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA

REGIÃO AMPLIFICADA	PRIMER	SEQUÊNCIA
ITS1-5, 8S-ITS2 DO rDNA	V9G <sup>1</sup>	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'
	ITS4 <sup>2</sup>	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

FONTE: De Hoog e Gerrits Van Den Ende (1998)<sup>1</sup>. White e Morrow (1990)<sup>2</sup>.



### REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

Fonte: Muehlmann-Fischer (2010) adaptado de Stringari (2009).

## GENE 16S rRNA

A amplificação do gene 16S foi realizada utilizando os *primers* rD1 e fD1. A reação de sequenciamento foi realizadas utilizando somente o *primer* rD1. Estes *primers* permitem a amplificação do gene 16S do RNA ribossomal de procariotos. Este gene, após a transcrição, dará origem ao RNA ribossômico.

SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO E NO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S DO rRNA

Referência	PRIMER	SEQUÊNCIA
Weisburg <i>et al.</i> , (1991)	fD1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
	rD1	5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'
Leonardo M. Cruz (Dep. Bioquímica UFPR)	362f	5' CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG 3'
	786f	5' CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG 3'



Representação esquemática do operon 16S-23S e região espaçadora com os respectivos primers de amplificação (fD1, 362f e 786f e rD1).

Fonte: o autor.

A amplificação do gene 16S rRNA com volume de 50  $\mu$ L, com 20ng de DNA-molde, 0,2  $\mu$ M dos iniciadores fD1 e rD1 (WEISBURG *et al.*, 1991), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 U/reação de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, SP, Brazil) e 1X tampão de Taq DNA polimerase. A PCR foi realizada em termociclador (Eppendorf®, modelo Mastercycler Gradient), com desnaturação inicial a 95°C por 2 min.; 30 ciclos de 15s a 94°C, 45s. a 93°C, 45s. a 55°C, 2 min. a 72°C; seguida de extensão final de 5 min. a 72°C. Os produtos da amplificação da PCR de 1.540-bp foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa, Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®), e visualizado como descrito acima.



### G) PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

Após realização da PCR tanto para a região ITS, quanto para gene 16S o produto desta reação é purificado adicionando-se 1  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5 M e 25  $\mu$ L de Etanol absoluto em cada poço da placa de reação. A mesma é vedada e misturada por imersão e então centrifugada por 45' a 3220 RCF por 15°C. O sobrenadante deverá ser descartado. A placa invertida deverá receber um spin a 300 RCF e em cada poço será adicionado 100  $\mu$ L de etanol 70% recém preparado, não gelado. Após, será dado um novo spin a 2500 RCF por 1' com a placa aberta. O sobrenadante é novamente descartado para um novo spin a 300 RCF. Adiciona-se então 12  $\mu$ L de água ultra pura e o material deverá ficar ressuspendendo por 12 horas para posterior quantificação do produto (GOMES, 2008).

A quantidade e a pureza de ácidos nucleicos será determinada por densidade óptica utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> 2000 (*Thermo Scientific*) e também utilizando-se gel de agarose 1,5% (p/v).

### H) REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 e 16S do rDNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia segundo Sanger et al. (1977). Neste, há a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em Seqüenciador Automático *MegaBACE<sup>TM</sup> 1000 DNA Analysis Systems* (*Amersham Biosciences<sup>®</sup>*).

O produto da PCR deverá ser diluído para concentração final de 10ng. Para a reação de sequenciamento utiliza-se cerca de 50 ng de DNA purificado para região ITS1-5,8S-ITS2 e 80ng de DNA para gene 16S, 2  $\mu$ L (1  $\mu$ M, ou 10 pmols) do *primer* ITS1 e 2  $\mu$ L de mistura para sequenciamento ET (kit: “*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE<sup>®</sup>*”; *Amersham Biosciences<sup>®</sup>*), completando com 2  $\mu$ L de água ultrapura para um volume final de 10  $\mu$ l. As mesmas condições são aplicadas para todos os primers.

### PURIFICAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para purificação do produto do sequenciamento, utiliza-se o gel de filtração Sephadex<sup>TM</sup> G-50 medium (*GE Healthcare*). Para tal, deverá ser

colocado pequenas quantidades de Sephadex™ sobre um dos cantos da placa molde *MultiScreen Column Loader (Millipore)*, também chamada de “enchedor de colunas” e com auxílio de uma espátula de acrílico, deve ser espalhado até completar totalmente os poços. Encaixa-se a placa da reação sob a placa molde de modo que cada poço da placa corresponda a um poço do enchedor de colunas, para que virando-se as placas o sephadex seja assim transferido para a placa da reação.

Será acrescentado 300 µL de água ultrapura autoclavada em cada poço. A placa ficará em repouso por 2 a 3 horas, embaixo desta, deve-se deixar outra placa (que servirá como placa coletora) de 96 poços para evitar contato com superfícies sujas e também para retenção da água no momento da centrifugação. As duas placas devem ser fixadas com fita adesiva. Após, a placa será centrifugada a 910 RCF por 5', descarta-se a água da placa de apoio, acrescenta-se 100 µL de água ultrapura autoclavada em cada poço e centrifuga-se novamente a 910 RCF por 5'. Substituir a placa coletora por uma nova placa. Adicionar os 10 µL da reação de sequenciamento na placa de purificação sem encostar as ponteiras no sephadex. Centrifugar por 5' a 910 RCF. Fechar a placa com Filme Adesivo Plástico para vedação de microplacas (*Axygen*) e envolve-la com papel alumínio. Proceder à eletroforese em seqüenciador automático de DNA modelo *MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences®)*.

Os parâmetros de eletroforese selecionados durante o sequenciamento serão: voltagem de injeção de 2kV, tempo de injeção de 100 segundos, voltagem da corrida de 6kV e tempo de corrida de 240 minutos.

Através da utilização dos programas disponíveis no pacote de *softwares* do seqüenciador *MegaBACE* serão realizadas as análises das corridas realizadas. Eletroferogramas (gráficos formados a partir do sinal obtido com a emissão de fluorescência) são gerados pelo *Sequence Analyser*. Através do programa *ScoreCard* é possível verificar a eficiência e informações das seqüências, como por exemplo, o número de nucleotídeos obtidos.

## **I) CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICAS DAS BACTÉRIAS**

### **PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS EM MEIO SÓLIDO**

A produção de sideróforos será verificada para os isolados que apresentarem antagonismo individual. Primeiramente utilizando a análise de cromoazul S (CAS) ágar conforme segue (SCHWIN & NEILANDS, 1987) solução CAS: 60,5 mg de (CAS) serão dissolvidos em 50 mL de água destilada e misturada a 10 mL de ferro (III) (  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – cloreto férrico hexaidratado a 1mM em HCl – ácido clorídrico a 10 mM), autoclavar esta solução e reservar. Dissolver 72,9 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylamonium) em 40 mL de água, autoclavar e misturar sob agitação vagarosamente à solução acima.

Separadamente o meio DYGS deficiente de ferro, foi autoclavado. A solução de CAS será adicionada ao meio DYGS e vertido em placas de Petri, onde serão inoculados os isolados de bactérias e incubados a 28°C por cerca de cinco dias. A mudança de cor do meio de azul para amarelo será o indicativo da produção de sideróforos. Todo o material será lavado com HCl 6 N para retirada do ferro contaminante (SILVA-STENICO *et al.*, 2005).

#### PRODUÇÃO DE $\beta$ -1,3-GLUCANASE / CELULASE / QUITINASE

Método adaptado de Renwick *et al.* (1991) *apud* Catellan (1999) que para detectar a hidrólise de *b*-1,3-glucano por reação colorimétrica com solução do corante Vermelho de Congo (0,6 g/L de vermelho Congo em água destilada) em Meio Mineral como fonte de carbono, 0,5 g *b*-1,3-glucano (laminarina). Verter este meio em placas de Petri e colocar até 25 isolado por placa, incubar a 28°C por 3 dias. Após o período de incubação adicionar solução de vermelho Congo até cobrir o meio completamente, deixar à temperatura ambiente por 90 min e depois drenar o excesso. A reação será positiva se aparecerem zonas amarelo-alaranjadas ao redor das colônias.

Para teste de celulase substitui-se a fonte de carbono (laminarina) por 0,5% de carboximetilcelulose, seguindo o procedimento acima descrito. Após crescimento bacteriano adicionar a placa 10 mL do corante vermelho congo, após 15 minutos, lavar as placas com NaCl 5M (TEATHER; WOOD, 1982) e observar formação de halo ao redor da colônia.

Para detecção de quitinase substitui-se a fonte de carbono por 0,08% de quitina coloidal. Resultados positivos foram detectados pela formação de halo claro ao redor da colônia (RENEWICK *et al.* (1991).

## PRODUÇÃO DE QUITINA COLOIDAL A PARTIR DE CARAPAÇAS DE SIRI (MOURA *et al.*, 2005) com adaptações

Usou-se 50 g de carapaças de siri limpas e moídas com aproximadamente 4 mm de diâmetro, em um moinho de facas *WileyMill* – motor 1,1 kw. Esta etapa pode ser realizada triturando manualmente as cascas e em seguida utilizando um liquidificador com filtro para bagaço, neste triturar novamente e só aproveitar a moagem que passou pelo filtro, assim fica um pó fino relativamente parecido com a moagem do moinho de facas.

Na etapa de desmineralização, que tem por objetivo reduzir o teor de cinzas (sais de cálcio), utilizou-se solução de HCl a 7% (v/v) por 14h na proporção de 4:1 de solução ácida/carapaça. Em seguida foram realizadas lavagens com água pararetirada do reagente. Pode-se realizar secagem em estufa a 120°C até peso constante.

A etapa de desproteínização tem a função de reduzir o teor de nitrogênio protéico e foi feita com solução de NaOH 5%, durante 2h, em um agitador de *Wagner* a uma rotação de 60rpm. O reagente também foi retirado através de lavagens com água, e assim se obteve a quitina úmida. Pode-se realizar secagem em estufa a 120°C até peso constante.

Na etapa de desodorização o reagente utilizado foi o NaClO<sub>0,36%</sub> p/v, e teve por objetivo reduzir o pigmento e o odor da quitina, provenientes da matéria-prima. Esta etapa durou 3h, também sob agitação constante de 60rpm, na qual foram realizadas lavagens com água para retirada do excesso de reagente. A secagem foi feita em estufa a 120°C até peso constante.

Segundo Moura a quitina obtida por esse procedimento apresentou um grau de pureza de aproximadamente 99%.

## PRODUÇÃO DE AMILASE / PECTINASE

Para detecção de amilase, semear as bactérias por ponto em meio mínimo M9 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel. Após crescimento adicionar a placa 10 mL de solução de iodo que imediatamente deve ser lavado com água. A presença de halo incolor ao redor da colônia indica resultado positivo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

A detecção de pectinase foi realizada pelo mesmo procedimento descrito acima substituindo o amido por 1% de pectina. Para verificação do resultado

deve-se adicionar 10 mL de lugol e em seguida lavar com água. A presença de halo incolor ao redor da colônia indica resultado positivo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

#### DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA POR DEGRADAÇÃO DE CASEÍNA

Para este teste, os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri em meio Leite-desnatado-ágar (50 mL de leite desnatado esterilizado misturado a 55°C, um quinto do volume de 50 mL de tripticase-soja-agar e 4% ágar) a atividade de protease (degradação de caseína) foi determinada por formação de halos ao redor das colônias após cinco dias de incubação a 30 °C (BERG *et al.*, 2002).

#### DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMÔNIA

Utilizando o meio uréase, em tubos de ensaio com meio inclinado semear a bactéria, incubar por cerca de 5 dias e aguarda a mudança de cor. O meio original é verde e a mudança para azul indica resultado positivo pois ocorre alcalinização do meio, proporcionado pela produção de urease através da degradação da amônia (DYE, 1968).

#### DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE HCN

Em meio TSA a 1/10 suplementado com 4,4 g/L de glicina e 0,3 mM de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,081 g/L) (CASTRIC, 1975), repicar a bactéria. A glicina e o ferro estimulam a produção de HCN. Na tampa da placa colocar um disco de papel filtro que preencha a área por completo e embeber com a solução de ácido pícrico a 5% (amarelo) e NaCO<sub>3</sub> a 2%. Selar a placa com parafilme e incubar a 26°C por 48 h. A mudança de cor do papel de amarelo para marrom-alaranjado indica produção de HCN (BAKKER; SCHIPPERS, 1987).

Como a descoloração pode ocorrer devido a reação de outros compostos como ácido sulfídrico e aldeídos, recomenda-se testes mais específicos como o teste de Azul-da-Prússia (LORCK, 1948) ou teste isonicotínico ácido-barbitúrico (NAGASHIMA; OZAWA, 1981).

#### DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE AUXINA (KUSS *et al.*, 2007)

Alíquotas de 500  $\mu$ L de solução de cada um dos isolados bacterianos, ajustadas para DO 0,5, foram colocadas para crescimento em 20 mL de meio DYGS e incubadas por 72 horas a 30°C. Após esse período, 15 mL de cada uma das culturas homogeneizadas foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000g por, 15 min, a 4°C. Do sobrenadante obtido, 900  $\mu$ L foram vertidos em frascos, aos quais foram adicionados 1,5 mL de reagente de Salkowski (Sarwar & Kremer, 1995). Os frascos com o sobrenadante e o reagente de Salkowski foram, então, reservados por 30 min em ambiente escuro, para desenvolvimento de cor, que se apresenta rósea mais intensa quando há maior quantidade de ácido indolacético. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm (Asghar et al., 2002). A concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão, previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado, e quantidades conhecidas de ácido indolacético.

#### SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO (HARA; OLIVEIRA, 2004)

Foi utilizado o meio decultura desenvolvido por Sylvester-Bradley et al. (1982), com 10 g de glicose, 2 g de extrato de levedura e 18 g de ágar por litro. Foram acrescentadas as soluções A, com 5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 50 mL de água, e B, com 10 g de CaCl<sub>2</sub> em 100 mL de água, para a formação do fosfatode cálcio precipitado. Em seguida, ajustou-se o pH para 6,5. Os isolados foram repicados com o auxílio de uma alça de platina. O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida em torno da colônia, foi medido a cada três dias, por um período de 18 dias. A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Solubilização (IS), para cada isolado, pela fórmula:  $IS = \varphi \text{ Halo (mm)} / \varphi \text{ Colônia (mm)}$  (Berraquero et al., 1976).