

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA CRISTINA IKEDA

BIOPROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE RAÍZES  
DE MILHO (*Zea mays* L.) PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E  
CONTROLE BIOLÓGICO

CURITIBA  
2014

ANGELA CRISTINA IKEDA

BIOPROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE RAÍZES  
DE MILHO (*Zea mays* L.) PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E  
CONTROLE BIOLÓGICO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Doutora em Genética.

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

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

CURITIBA

2014

## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **ANGELA CRISTINA IKEDA**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

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

Curitiba, 19 de fevereiro de 2014



**Doutor Renan Augusto Ribeiro**  
Embrapa-Soja – Membro Titular



**Doutora Josiane Aparecida Gomes-Figueiredo**  
Universidade Estadual Do Paraná – Membro Titular



**Doutora Maria Berenice Reynaud Steffens**  
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

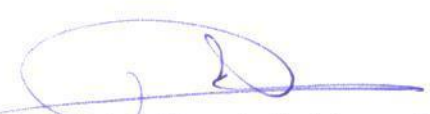


**Doutora Vanessa Kava-Cordeiro**  
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular



**Doutora Lygia Vitória Galli-Terasawa**  
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



**Prof<sup>a</sup> Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza**  
Coordenador do PPG - GEN - UFPR  
Matricula 176702

**Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Ficha catalográfica elaborada por Denis Uezu – CRB 1720/PR

Ikeda, Angela Cristina

Bioprospecção e identificação de bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.) para promoção de crescimento vegetal e controle biológico / Angela Cristina Ikeda. – 2014

92 f. : il.

Orientadora: Profª Drª Lygia Vitória Galli-Terasawa

Coorientadora: Drª Mariangela Hungria

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética. Defesa: Curitiba, 19/02/2014.

Área de concentração: Genética de Fungos e Bactérias

1. Bactérias. 2. Genética bacteriana. 3. Milho. 4. Teses. I. Galli-Terasawa, Lygia Vitória. II. Hungria, Mariangela. III. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD – 631.52

CDU – 633.15

**BIBLIOTECA**

Dedico este trabalho às bactérias,  
que doaram suas vidas  
à minha pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná e aos professores do Departamento de Genética pelas oportunidades e contribuições em minha formação acadêmica.

À CAPES pela bolsa REUNI concedida durante o primeiro ano de doutorado.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lygia Vitória Galli-Terasawa pela orientação, confiança e amizade construídas durante nossa convivência profissional e pessoal.

À Dr<sup>a</sup> Mariangela Hungria pela acolhida, dedicação e paciência nas correções e acompanhamentos de projetos, relatórios e artigos.

Ao Dr. Francisco Terasawa Junior representando a Semília Genética e Melhoramento Ltda pelos materiais biológicos cedidos para o desenvolvimento dos experimentos em laboratório e casa de vegetação.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Chirlei Glienke e ao prof. Dr. Átila Mórgor pelo apoio técnico e incentivo como banca de acompanhamento no desenvolvimento desse trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava-Cordeiro pela acolhida e amizade.

Aos membros da banca de defesa: Renan Ribeiro, Berenice Steffens, Josiane Figueiredo e Juliana Zanetti pela disponibilidade e contribuições para o aprimoramento desse trabalho.

Aos colegas e técnicos do LABGEM da UFPR pela colaboração, em especial à Mariana D'Ávilla Ogg pelo apoio de bancada e ao amigo Douglas Adamoski pelo companheirismo.

Aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia de Solos da EMBRAPA Soja de Londrina, pela disponibilidade e auxílio na preparação de experimentos e em discussões de análise de dados.

Ao prof. Dr. Antonio Higa e a toda a equipe do LAMEF pela compreensão e incentivo, em especial à Andrea Cusatis pelo compartilhamento de ideias e ideais.

Aos amigos e amigas das turmas de italiano, de circo, de dança e ao Paulo Carneiro por me ajudarem a entender minhas frustrações e encontrar inspiração para seguir adiante.

Às amigas Josiele, Lisandra e Vivian pelo companheirismo e amizade, pela parceria de bancada, campo, congressos, conversas de bar e almoços terapêuticos.

Aos meus pais, Oscar e Silvana, minhas irmãs Mônica e Priscila pela paciência e compreensão nos momentos que não pude estar, ou que estive, mas não fui o meu melhor.

Ao Elder, por me fazer acreditar que posso ser mais a cada dia.

## AO LEITOR

Caro leitor, obrigada por se interessar por este trabalho. Aqui estão os resultados, nem todos, porque como toda pesquisa, muitas tentativas e erros acabam esquecidos nas folhas de diários de bancada... mas aqui estão os mais sinceros e dedicados resultados de um trabalho de seis anos. Conto como seis anos, os dois de mestrado e quatro de doutorado, desde quando conheci esse universo de interações entre as bactérias e o milho. Nos anos de mestrado, aprendi muitas atividades práticas, tanto em laboratório quanto em campo. Foram dois anos de intenso trabalho que serviu de base para continuidade de um doutorado. Nesse mesmo tempo conheci muitos pesquisadores que me inspiraram, amigos que me incentivaram, e aos poucos fui conhecendo meu próprio ritmo de trabalho. Confesso que ainda não sabia ao certo qual o lugar que eu ocupava em toda esta história, de repente e naturalmente, entrei no doutorado. Foi quando conquistei outras aspirações que nem pretendia de começo. Aprendi algumas práticas de laboratório, conheci outros grupos de pesquisa, participei com mais lucidez de eventos da área, deixei de admirar alguns pesquisadores e colegas para passar a admirar outros... O mais interessante foi perceber que todo trabalho é como se fosse apenas mais um motivo para querermos nos fazer existir na história. No final, já a beira da desistência, em meio a relatórios, qualificação, referees e decepções, percebi que ainda faltou fazer muita coisa, que poderia ter sido melhor ou apenas diferente. Mas percebi também, que sempre vai faltar alguma coisa e que sempre poderia ter sido diferente, pois o melhor parece estar sempre preso no tempo que não aconteceu. Acabei percebendo que a insatisfação é o que nos move. E também, que não é a reprodução de protocolos que alimenta a pesquisa, e sim as dúvidas incômodas que por vezes nunca saberemos a resposta. Sinceramente, acho que com este trabalho terei muito mais que um título acadêmico. Com ele, conquistei maturidade e serenidade para entender o tempo das coisas e assim perceber o meu próprio tempo para desfrutar delas. Espero que este trabalho seja útil de algum modo, seja para o ajuste de algum protocolo, para despertar uma ideia, ou apenas para lembrar que esse tempo acontece para todos.

## **Ilusión**

*Uma vez eu tive uma ilusão  
E não soube o que fazer, não soube o que fazer  
Com ela, não soube o que fazer  
E ela se foi  
Porque eu a deixei, por que eu a deixei?  
Não sei  
Eu só sei que ela se foi...*

*Mi corazón desde entonces la llora diario, no portão  
Por ella, no supe que hacer  
Y se me fue  
Porque la dejé, ¿por que la dejé?  
No sé  
Sólo sé que se me fue...*

*Sei que tudo o que eu, queria  
Deixei, tudo o que eu, queria  
Porque, não me deixei tentar  
Vivê-la feliz*

*É a ilusão  
De que volte o que me faça feliz, faça viver  
Por ella no supe que hacer  
Y se me fue  
Porque la dejé, ¿por que la dejé?  
No sé  
Sólo sé que se me fue...*

Marisa Monte e Julieta Venegas

*"Pintou estrelas no muro,  
e teve o céu ao alcance das mãos."*

Helena Kolody

## RESUMO

A cultura de milho (*Zea mays* L.) tem um papel de destaque mundial, sendo matéria-prima principalmente no ramo de produção de ração. O desenvolvimento de inoculantes com cepas bacterianas é uma alternativa procurada para incrementar na produtividade da cultura e diminuir tanto o impacto ambiental como o custo para o produtor. Bactérias endofíticas e rizobactérias podem interagir com a planta de forma direta, fornecendo substâncias que auxiliam no crescimento vegetal. Dentre essas substâncias estão o ferro, por meio da produção de sideróforos; o fósforo, por meio da solubilização de fosfato e o ácido indol acético (AIA), pela produção direta de fitormônios. Denominadas PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*), estas bactérias também podem atuar como antagonistas a fitopatógenos, produzindo enzimas líticas que impedem sua colonização ou por meio de competição por espaço e nutrientes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar fisiológica e filogeneticamente, isolados de bactérias com ação de promoção de crescimento em plantas de milho por meio de testes *in vivo* e sequenciamento do gene ribossomal 16S. De uma coleção de 150 isolados, nove foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA* em sete diferentes gêneros. Todos foram caracterizados quanto à fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, amilase, celulase, lipase, pectinase, protease, quitinase e urease. Também, foi realizada a quantificação da produção de AIA e teste de antagonismo contra seis fungos isolados de folhas de milho (*Alternaria* sp., *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides*, *Cercospora* sp., *Bipolaris* sp. e *Diaporthe* sp.). Os isolados foram inoculados em sementes de milho com medição de comprimento e volume da raiz e do hipocótilo para representação do crescimento vegetal. Os isolados potenciais promotores de crescimento vegetal foram LGMB221 (*Achromobacter* sp.) e LGMB242 (*Klebsiella* sp.). Já os potenciais biocontroladores foram LGMB143 (*Bacillus* sp.) e LGMB152 (*Burkholderia* sp.). Em uma segunda etapa, uma coleção de 173 isolados bacterianos foi testada para atividade promotora de crescimento, sendo doze selecionados por apresentarem resultados positivos para produção de sideróforos, solubilização de fosfato, atividade de fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA. Os isolados foram inoculados em dois híbridos de milho (ATL100 e KWX628) para as seguintes avaliações biométricas: número de folhas (número por planta), diâmetro do colmo (mm), altura (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>), comprimento radicular (cm), massa da raiz seca (g), massa da folha seca (g), nitrogênio e fósforo foliar (mg/g). Para o híbrido ATL100, o isolado LGMB208 apresentou os melhores resultados nas avaliações biométricas e para o híbrido KWX628, os isolados LGMB125, LGMB225, LGMB239 e LGMB274 apresentaram os melhores resultados no total das avaliações das plantas inoculadas. As cepas com melhores desempenhos são promissoras para confecção de inoculantes alternativos para cultura de milho.

Palavras-chaves: *Zea mays* L., PGPB, antagonismo, FBN, 16S *rRNA*.

## ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) crop is widespread overall the world, it is a raw material for several products, mainly for animal or human feed. The development of inoculants which contains bacterial strains is an alternative to improve the production of this crop, also to reduce environmental impact and decrease producer costs. Endophytic bacteria and rhizobacteria can interact with plant directly, providing substances that help plants growth. Among these substances there are iron (siderophores production), phosphorus (phosphate solubilization) and indole acetic acid (IAA by direct production of phytohormones). The Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) can also act as antagonist against phytopathogens through competition by space and nutrition by producing lytic enzymes that block its colonization. The main goal of this work is to characterize physiologically and phylogenetically bacterial strains that act as plant growth, putting forward *in vitro* tests and 16S ribosomal gene sequencing. From a collection of 150 bacterial isolates, nine strains were identified as partial 16S *rRNA* gene sequencing covering seven different genera. They were characterized by biological nitrogen-fixing, phosphate solubilization, production of siderophores, amylase, cellulase, lipase, pectinase, protease, chitinase and urease. It was also considered IAA production and antagonism test against six fungi isolated from corn leaves lesions (*Alternaria* sp., *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium verticillioides*, *Cercospora* sp., *Bipolaris* sp. and *Diaporthe* sp.). These bacteria were inoculated on maize seeds and they were measured length and volume of root and hypocotyl. The best potentially plant growth promoters were: LGMB221 (*Achromobacter* sp.) and LGMB242 (*Klebsiella* sp.). The best potentially biocontrollers were: LGMB143 (*Bacillus* sp.) and LGMB152 (*Burkholderia* sp.). At a second step, a bacterial collection containing 173 isolated bacteria was tested as plant growth activity and twelve strains were selected by positive results for siderophore production, phosphate solubilization, biological nitrogen fixation and IAA production. These strains were inoculated in two maize hybrids (ATL100 and KWX628) to be evaluated the following biometric characteristics: number of leaves (number per plant), stem diameter (mm), height (cm), leaf area (cm<sup>2</sup>), root length (cm), root dry weight (g), leaves dry weight (g), nitrogen and phosphorus of leaves (mg/g). For the ATL100 hybrid, the strain LGMB208 showed the best results concerning all the evaluations and for hybrid KWX628: LGMB125, LGMB225, LGMB239 and LGMB274 showed the best results. These strains are the best option of inoculants development for corn crop.

Keywords : *Zea mays* L., PGPB, antagonism, BNF, 16S *rRNA*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
1.1	CULTURA DO MILHO.....	14
1.2	BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOBACTÉRIAS.....	16
1.3	CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA.....	18
1.4	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO...20	
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>24</b>
	Diversidade e potencial de atividade promotora de crescimento vegetal de bactérias isoladas de raízes de milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	24
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>40</b>
	Avaliação da atividade promotora de crescimento vegetal e identificação de bactérias visando seleção de estirpes para produção de inoculantes.....	40
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>67</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>68</b>
	<b>RESULTADOS ESTATÍSTICOS PARA ANTAGONISMO.....</b>	<b>69</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS DETALHADOS.....</b>	<b>69</b>
	MATERIAL BIOLÓGICO.....	69
	CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA.....	70
	Extração de DNA Genômico.....	70
	Amplificação do gene <i>16S rRNA</i> .....	71
	Sequenciamento do gene <i>16S rRNA</i> .....	73
	Amplificação do gene <i>nifH</i> .....	75

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO.....	76
<b>Mecanismo direto por aumento da disponibilidade de nutrientes .....</b>	<b>76</b>
<i>Produção de Sideróforo .....</i>	<i>76</i>
<i>Solubilização de Fosfato .....</i>	<i>76</i>
<i>Fixação Biológica de Nitrogênio.....</i>	<i>77</i>
<b>Mecanismo direto por produção de fitormônio .....</b>	<b>77</b>
<i>Produção de Ácido Indol Acético .....</i>	<i>77</i>
<b>Mecanismo indireto por produção de enzimas .....</b>	<b>78</b>
<i>Produção de amilase.....</i>	<i>78</i>
<i>Produção de celulase.....</i>	<i>79</i>
<i>Produção de pectinase.....</i>	<i>79</i>
<i>Produção de quitinase.....</i>	<i>79</i>
<i>Produção de urease.....</i>	<i>80</i>
<i>Deteção de atividade esterásica .....</i>	<i>80</i>
<i>Deteção de atividade proteolítica .....</i>	<i>81</i>
<b>Mecanismo indireto por antagonismo a fungos.....</b>	<b>81</b>
<b>Teste de Germinação .....</b>	<b>81</b>
<b>Experimento em Casa de Vegetação.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é originário das Américas, possivelmente do México, na América Central ou do Sudoeste dos Estados Unidos. É uma das culturas mais antigas do mundo, cultivado há pelo menos 5.000 anos, segundo escavações arqueológicas e geológicas. Pertence à família das Poáceas, é uma espécie anual, monóica, pertencente ao grupo das plantas C-4, ou seja, tem alta taxa de fotossíntese líquida e alta afinidade ao CO<sub>2</sub>, além de apresentar ampla adaptação a diferentes condições ambientais (ADVFN, 2012).

Esta cultura tem um papel de destaque mundial, com o Estado do Paraná sendo o primeiro produtor no Brasil. Inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas para esse cultivo, como inoculantes a partir de bactérias que possam interagir com a planta de forma direta ou indireta, seja possibilitando a produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, de substâncias inibidoras de agentes causadores de doenças ou até mesmo por meio de competição por espaço e nutrientes com fitopatógenos.

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, é plantada quase sempre após a soja precoce. Com a popularidade da soja no mercado internacional, o milho acabou perdendo áreas de cultivo de verão, levando ao aumento do cultivo na segunda safra e elevando significativamente a produção no inverno. A safrinha é uma opção de substituição da cultura do trigo após a soja, somente em regiões quentes. Inicialmente, começou como um cultivo marginal feito pelos agricultores, tornando-se atualmente um cultivo maior que o da 1ª safra. Atualmente, há programas de melhoramento específicos para a recomendação de variedades destinadas à safrinha (TERASAWA JUNIOR, 2006).

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2014), a produção mundial de milho gira em torno de 900 milhões de toneladas, sendo a maior produção mundial dos Estados Unidos. Em seguida está a China e

em terceiro lugar o Brasil segue com produção estimada de 75 milhões de toneladas de milho para safra 2013/2014. Segundo dados do Departamento de Economia Rural – DERAL (2014) o Paraná ocupa lugar de destaque na produção nacional de milho com 11,6 milhões de toneladas produzidas na safrinha e 5,8 milhões produzidas na safra de verão.

A deficiência de nitrogênio (N) é um fator importante que limita a produtividade de biomassa em ecossistemas naturais e agrícolas. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Milho e Sorgo (2009), a recomendação da adubação nitrogenada em cobertura para a cultura do milho varia de 40 a 80 kg de N/ha. Com o uso de alta tecnologia, doses de nitrogênio variando de 100 a 150 kg/ha podem ser necessárias para a obtenção de elevadas produtividades. Sob a ótica econômica e ambiental, a decisão sobre a necessidade de adubação nitrogenada deve levar em consideração alguns fatores para uma recomendação mais segura, tais como: condições edafoclimáticas, sistema de cultivo, época de semeadura, responsividade do material genético, rotação de culturas, época e modo de aplicação, fontes de N, aspectos econômicos e operacionais (BOBATO, 2006).

A utilização de inoculantes atua de maneira a aumentar a produtividade de determinada cultura, além de melhorar a qualidade dos solos, reduzir os custos e a quantidade de adubos nitrogenados com vistas à preservação ambiental. Um inoculante é caracterizado como o material que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas, composto por bactérias específicas para cada espécie vegetal. Trabalhos com inoculantes produzidos a partir de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio buscam avaliar sua contribuição na eficiência de crescimento vegetal e ganho de produtividade, bem como na diminuição do impacto ambiental proporcionado, além de reduzir custos de produção (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

No Brasil, o primeiro inoculante comercial para milho e trigo foi desenvolvido pela EMBRAPA Soja e a Universidade Federal do Paraná em parceria com a iniciativa privada (HUNGRIA *et al.*, 2010). O produto é comercializado por cerca de R\$10,00 a dose/hectare e a inoculação é feita pela aplicação do produto sólido ou líquido nas sementes. Como o inoculante carrega microrganismos vivos, é preciso monitorar aspectos para sua manutenção, tais como: temperatura, não exposição direta ao sol e não aplicação conjunta com agrotóxicos. Os trabalhos que levaram

ao desenvolvimento do inoculante foram realizados com seis estirpes de *Azospirillum brasilense* e mostraram incremento médio de 25% a 30% no rendimento do milho, o que significaria uma economia em torno de U\$1 bilhão por safra, considerando uma área cultivada de 13 milhões de hectares com rendimento médio de 3.200 kg/ha.

Assim, é possível que além de realizar fixação biológica do nitrogênio (FBN), bactérias que compõem inoculantes podem promover o crescimento das plantas produzindo substâncias que resultam em crescimento radicular e consequente aumento na absorção de água e nutrientes, o que acarreta em incremento geral de crescimento na planta.

## 1.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOBACTÉRIAS

Os microrganismos capazes de colonizar tecidos internos de um vegetal foram denominados como endofíticos por De Bary em 1866 (STONE, 1988). Em 1991, Petrini propôs uma expansão da definição para incluir todos os organismos capazes de colonizar tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente. Assim, a partir de estudos em tecidos internos de plantas saudáveis, foi desenvolvida a ideia de que bactérias não patogênicas que habitam tecidos da planta são denominadas endofíticas. Os relatos preliminares as consideravam como contaminantes resultantes da desinfestação superficial ou patógenos fracamente virulentos. Entretanto, já havia indícios de que essas bactérias poderiam influenciar no crescimento vegetal e reduzir sintomas de fitopatologias (HALLMANN *et al.*, 1997).

As plantas oferecem uma ampla variedade de habitat para o crescimento de bactérias. A superfície de sementes, raízes, folhas e frutos podem abrigar diversas comunidades microbianas, mas flores, caules, tecidos vasculares e espaços intercelulares suportam comunidades bacterianas limitadas (BEATTIE, 2006). Microrganismos endofíticos podem ser encontrados em espaços intercelulares de raízes e folhas, onde acessam nutrientes e água facilmente. Já os rizosféricos são atraídos por secreções das raízes que favorecem a abundância e a atividade na rizosfera (GALVÃO *et al.*, 2010).

Em sítios endofíticos, os microrganismos acessam mais facilmente nutrientes e água do que na superfície, além de estarem mais protegidos das flutuações das condições ambientais. As bactérias podem penetrar na planta por lesões na epiderme ou por raízes laterais e radícula emergente, além de aberturas naturais como estômatos, lenticelas e hidatódios. Algumas bactérias endofíticas liberam enzimas hidrolíticas como celulase ou pectinase, que ajudam na sua penetração pelas raízes (HALLMANN, 2001). As bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam raízes de plantas não-leguminosas sem causar alterações estruturais são chamadas associativas ou endofíticas facultativas. A descoberta de bactérias endofíticas diazotróficas colonizadoras de tecidos vegetais tornou possível a seleção de estirpes eficientes para ampliar a produção agrícola (ELMERIC; NEWTON, 2007).

A rizosfera é o volume de solo ao redor e que está sobre influência das raízes de plantas, e o rizoplane é a superfície das raízes de plantas e suas partículas fortemente aderidas (KENNEDY, 2005). Alguns autores utilizam as duas definições para caracterizar tanto a rizosfera como também a comunidade de bactérias de dentro do tecido radicular (ANTOUN; PRÉVOST, 2005; NHEL; ALLEN; BROWN, 1997). A rizosfera representa uma região de alta composição nutricional, pois as raízes transferem para o solo exsudados, secreções e compostos provenientes de lise celular. Dentre os principais compostos está a mucilagem que contém polissacarídeos hidratados, ácidos orgânicos, vitaminas e aminoácidos. Essa rizodeposição favorece abundância microbiana e atividade rizosférica, formando um habitat microbiano do solo mais ativo (GALVÃO *et al.*, 2010).

A produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas tem sido observada em bactérias como as dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Isto pode ser ilustrado pelo trabalho de Weber, Baldani e Döbereiner (2000) no qual foi demonstrada pela primeira vez a contribuição de bactérias diazotróficas no crescimento de bananeira. Há tempos estudos de associação assimbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio com raízes de milho têm apresentado resultados promissores. O trabalho de Raju, Evans e Seider (1972) já trazia considerações preliminares sobre pesquisas focadas na fixação biológica de nitrogênio considerando plantas não leguminosas. Os autores discutem aspectos da atividade microbiológica na rizosfera de várias espécies de plantas, buscando evidências da atividade de fixação de nitrogênio, ainda desconhecida na época. Também,

atualmente bactérias até então conhecidas como colonizadoras exclusivas de gramíneas, podem ser encontradas em diversas culturas, como, por exemplo, *Herbaspirillum seropedicae* colonizando raízes de feijão (SCHMIDT, 2011).

Desde o isolamento de *Beijerinckia fluminense* da rizosfera de cana-de-açúcar (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958) e com a reidentificação de *Azospirillum lipoferum* isolado de raízes de diversas gramíneas (DÖBEREINER; DAY, 1976), novas espécies de bactérias diazotróficas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas, cafeeiros, bananeiras, abacaxizeiros, plantas como batata-doce e mandioca. Bactérias do gênero *Azospirillum* também foram observadas na rizosfera de outras fruteiras (WEBER; BALDANI; DÖBEREINER, 2000).

Na cultura do milho, existem diversos estudos de associações com bactérias fixadoras de nitrogênio. Mesmo não formando nódulos, estas bactérias auxiliam na assimilação do nitrogênio atmosférico por processos de colonização da superfície e/ou interior das raízes. Isso ressalta a importância da seleção de estirpes adaptadas às condições de cultivo para possíveis recomendações com fins comerciais (BODDEY; DÖBEREINER, 1995; BALDANI *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; ROESH *et al.*, 2005).

É bom ressaltar que a identificação dos isolados bacterianos é importante para o controle em inoculantes que, de acordo com cada cultura, devem conter exclusivamente estirpes selecionadas. Deste modo, a caracterização por técnicas moleculares devem ser utilizadas para agregar informações na identificação desses microrganismos.

### 1.3 CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA

Os primeiros trabalhos utilizavam reações bioquímicas e técnicas de marcadores morfológicos para caracterização e classificação taxonômica de bactérias. Até 1975 a ideia de sequenciamento de cromossomos inteiros parecia improvável. Atualmente, inúmeras sequências completas de muitas espécies já são conhecidas e registradas em bancos genéticos públicos. A descoberta das enzimas de restrição, da clonagem gênica, da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e o aprimoramento dos processos de eletroforese, com máquinas automatizadas de

sequenciamento, permitem as análises de DNA em larga escala (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

Em análises taxonômicas, a base dos critérios de agrupamento e de classificação passou de apenas morfológica para critérios moleculares. Sequências de nucleotídeos altamente conservadas em bactérias tornaram-se fundamentais para a revisão das relações evolutivas entre espécies, gêneros e até famílias (OLSEN; WOESE; OVERBEEK, 1994). O uso da sequência de nucleotídeos do gene que codifica o *16S rRNA* (subunidade menor do ribossomo) foi utilizado como método padrão de análise filogenética para bactérias. Desta forma, estudos iniciaram o uso de sequenciamento total ou parcial dos genes (*16S rRNA* e *23S rRNA*), bem como regiões intergênicas (IGS – *Intergenic Spacer*) para estudos de filogenia (GURLER; STANISH, 1996). Portanto, o sequenciamento da região do DNA que codifica o gene *16S rRNA* ainda é uma ferramenta importante para determinar a posição taxonômica de estirpes de bactérias em nível de gênero.

Atualmente, além do sequenciamento do gene *16S rRNA* também são utilizados para análise filogenética os sequenciamentos de genomas completos (ORMEÑO-ORRILLO, *et al.*, 2012) e de genes *housekeeping* em análise MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) como, por exemplo, os genes *recA*, *atpD*, *rpoB*, *gyrB*, entre outros. Esses genes são importantes para análises de descrição de espécies (RIBEIRO *et al.*, 2013) e estudos de interação simbiótica entre planta e bactéria (DALL'AGNOL *et al.*, 2013), podendo assim, fornecer informações complementares ao sequenciamento genômico de bactérias de interesse biotecnológico.

A técnica de Sanger, Nicklen e Coulson (1977) usando fluoróforos marca a história como sequenciamento de primeira geração. Esta técnica foi largamente difundida e ainda hoje é aplicada para sequenciamentos em baixa escala. Com o aumento da demanda, novas tecnologias para produção de sequências foram desenvolvidas. O pirosequenciamento ou sequenciamento de segunda geração é utilizado, por exemplo, para obtenção de sequências de genes *housekeeping* como *16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB*, *rpoD* e até mesmo análise do genoma completo de bactérias para análises filogenéticas (DUAN *et al.*, 2013). Ainda, a biologia molecular dispõe de técnicas de sequenciamento de terceira e quarta gerações, onde é crescente o número de corridas e de leituras por corrida, de forma inversamente proporcional ao custo para produzi-las (EVARISTO, 2013).

#### 1.4 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO

As bactérias com ação promotora de crescimento vegetal são denominadas PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria*) (KLOEPPER; SCHROTH, 1978). Elas podem estar relacionadas ao aumento do comprimento de raízes e do número de pelos radiculares, efeitos atribuídos à produção de hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal. O maior desenvolvimento do sistema radicular significa vantagem na exploração do solo e com isso, a planta está mais protegida da escassez de nutrientes e do déficit hídrico (CAMPO; HUNGRIA, 2007; HUNGRIA, 2011). As PGPBs podem promover crescimento indiretamente pela supressão de microrganismos deletérios que inibem o crescimento vegetal. O biocontrole de fitopatógenos envolve substâncias produzidas pelas bactérias que possuem efeito antibiótico e antifúngico (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003). Além da produção de substâncias, a competição por nutrientes e por sítios de colonização, bem como a indução de resistência sistêmica são mecanismos utilizados pelas PGPBs (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

Bactérias desenvolveram um sistema de captação de ferro por meio da secreção de sideróforos que são compostos de baixo peso molecular, queladores de ferro produzidos sob condições limitantes desse elemento (ARAÚJO *et al.*, 2010). A complexação por sideróforos diminui a disponibilidade do íon de ferro livre podendo assim, afetar o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos menos eficientes quanto ao metabolismo de ferro (CAMPO; HUNGRIA, 2007). Essas moléculas captam o  $Fe^{+3}$  do solo, o complexo é reconhecido na célula e o  $Fe^{+3}$  é transportado pela membrana celular para ser utilizado pela célula vegetal ou até mesmo pelo próprio microrganismo (BUYER; KRATZKE; SIKORA, 1993). Portanto, bactérias que disponibilizam esse elemento para a planta podem promover seu crescimento por meio da produção de sideróforos.

Muitas bactérias promovem a melhoria da nutrição vegetal disponibilizando nutrientes como o fósforo por meio de solubilização de fosfatos inorgânicos. Mesmo em solos ricos em fósforo, esse elemento pode ser encontrado de forma complexada, imobilizado pela interação com ferro e alumínio. Também, o fitato representa de 20 a 50 % do fosfato orgânico do solo e a fitase, enzima que hidrolisa o fitato, já foi descrita em bactérias dos gêneros *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp.,

*Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. (VOHARA; SATYANARAYANA, 2003; KEROVUO *et al.*, 1998). O restante encontra-se na forma inorgânica e não é prontamente disponível às plantas. Assim, microrganismos solubilizadores de fosfato podem mobilizar outros nutrientes do solo aumentando o rendimento e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (GALVÃO *et al.* 2010).

Bactérias diazotróficas podem ser consideradas promotoras de crescimento vegetal de forma direta. Inúmeras bactérias de vida livre, endofíticas e de rizosfera são descritas como bactérias diazotróficas, ou seja, fixadoras de nitrogênio por reações bioquímicas da FBN que convertem nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $N_3$ ) (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003). Bactérias PGPBs não associativas não causam modificações morfológicas nas raízes e participam da interação com plantas C3 e C4 (arroz, trigo, milho, cana-de-açúcar, algodão) aumentando significativamente o crescimento e produtividade dessas plantas (HAYAT, 2010). A atividade de FBN é realizada pela enzima nitrogenase. O teste realizado a partir de meios líquidos e semi-sólidos permite que a bactéria inoculada se multiplique em condições ótimas de fixação de nitrogênio, ou seja, baixas tensões de oxigênio que permitam a divisão celular sem inibir a atividade da nitrogenase (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). A nitrogenase possui múltiplas subunidades codificadas pelos genes *nifH*, *nifD* e *nifK*. O gene *nifH* é um dos mais investigados como marcador em estudos de filogenia, diversidade e abundância de microrganismos (GABY; BUCKLEY, 2012).

Além da FBN, bactérias também promovem o crescimento vegetal por meio da produção de substâncias como fitormônios que incrementam o sistema radicular. Os hormônios sintetizados pelas plantas agem como mensageiros para regular o crescimento, desenvolvimento e diferenciação de células e tecidos. Vessey (2003) observou que estirpes de bactérias promoveram crescimento devido à produção de fitormônios como auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e ácido abicísico. As auxinas configuram um dos mais importantes fitormônios e dentre elas, destaca-se o ácido indol acético (AIA). As auxinas são produzidas no ápice vegetal e distribuídas por transporte polarizado do ápice para o restante da planta, sendo que muitos microrganismos produzem análogos desse fitormônio e colonizam diferentes órgãos das plantas. Isso significa que eles exercem efeitos benéficos como aumento da taxa de germinação de sementes, desenvolvimento de órgãos, produção de

flores e rendimento de culturas em casa de vegetação e no campo (DEY *et al.*, 2004).

Bactérias são capazes de produzir AIA, este atua na embriogênese, na diferenciação de órgãos, arquitetura de raízes e parte aérea, dominância apical e respostas trópicas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). São descritas várias rotas de produção de AIA, por exemplo, a via IPy-A que ocorre pela enzima indol-3-piruvato é descrita em várias bactérias como *Azospirillum* spp., *Bradyrhizobium* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium* spp. (GALVÃO *et al.*, 2010). Há evidências de que existe um limiar de produção de AIA, uma vez que altas quantidades desse fitormônio podem afetar o crescimento das raízes (ARRUDA, 2012).

Com relação ao desempenho *in vitro* de bactérias para promoção de crescimento vegetal de forma indireta, podem ser realizados testes relacionados à competição com fitopatógenos por nutrientes ou nicho, à produção de enzimas que facilitem a entrada no hospedeiro, à degradação de parede celular por ação de enzimas líticas e à produção de substâncias antimicrobianas e compostos voláteis (WINDING; BINNERUP; PRITCHARD, 2004).

Testes *in vitro* para detecção de enzimas funcionais são importantes para estabelecer um indicativo de que bactérias podem inibir fitopatógenos. Por exemplo, as proteases clivam ligações peptídicas e de modo geral, têm função de degradação da parede celular do hospedeiro (KUBICEK, 1992). Em fungos fitopatógenos de milho, enzimas extracelulares como as hidrolases são consideradas as principais envolvidas em processos de parasitismo (ZEILINGER; OMANN, 2007).

Inúmeros fatores fisiológicos dos isolados bacterianos podem interagir com o sistema vegetal para que ocorram ações diretas ou indiretas favoráveis à planta. Esses fatores incluem a produção de substâncias com atividade antagonista a fitopatógenos e de compostos relacionados à maior disponibilidade de substâncias promotoras de crescimento vegetal (GALVÃO *et al.*, 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fisiológica e filogeneticamente bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.) quanto à promoção de crescimento vegetal e controle biológico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar o DNA codificante do gene *16S rRNA* de bactérias do banco genético do LabGeM – UFPR para identificação em nível de gênero;
- Testar *in vitro* a produção de amilase, celulase, pectinase, quitinase, urease e a atividade esterásica e proteolítica para caracterização enzimática destes isolados bacterianos;
- Testar a ação biocontroladora das bactérias caracterizadas fisiologicamente, por meio de antagonismo *in vitro* contra fungos isolados de lesões em folhas de milho;
- Testar *in vitro* a capacidade de produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de AIA e fixação biológica de nitrogênio como indicativo de atividade promotora de crescimento destes isolados bacterianos;
- Avaliar bactérias de alto desempenho nos testes laboratoriais, em experimento de casa de vegetação quanto ao efeito da inoculação no desenvolvimento de dois híbridos de milho.

### 3 CAPÍTULO 1

#### Diversidade e potencial de atividade promotora de crescimento vegetal de bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.)

#### RESUMO

Nove isolados bacterianos provenientes de raízes de milho (*Zea mays* L.) foram identificados por sequenciamento parcial do gene 16S *rRNA* como pertencentes a sete diferentes gêneros: *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp., *Paenibacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Shigella* sp. Destes nove isolados, cinco isolados apresentaram resultado positivo para produção de sideróforos, três para produção de urease, dois para produção de lipase, pectinase, protease e quitinase, e apenas um para produção de amilase e celulase. A produção de auxina foi quantificada, e o isolado LGMB143 *Bacillus* sp. apresentou-se como maior produtor (25,75 µg/mL). No teste de antagonismo contra fungos isolados de lesões em folhas de milho, o isolado LGMB152 *Burkholderia* sp. apresentou antagonismo estatisticamente significativo contra quatro dos seis fungos testados (*Fusarium verticillioides*, *Cercospora* sp., *Bipolaris* sp. e *Diaporthe* sp.). O isolado LGMB221 *Achromobacter* sp. apresentou diferenças estatísticas no comprimento e volume de hipocótilo e o isolado LGMB242 *Klebsiella* sp. no comprimento e volume de raiz de sementes de milho germinadas previamente inoculadas com os isolados bacterianos. O isolado LGMB235 *Stenotrophomonas* sp. destacou-se na produção de AIA (14,24 µg/mL) em conjunto com produção das enzimas. Na sequência de avaliação de desempenho, apareceu o isolado LGMB152 (2,54 µg/mL) com seis resultados positivos dentre os dez testes conduzidos *in vitro*, além de melhor performance no teste de antagonismo contra os fungos testados. Estes isolados se apresentaram promissores para testes em hospedeiros vegetais, visando a produção de inoculantes comerciais.

## INTRODUÇÃO

Associações vantajosas observadas entre raízes de milho (*Zea mays* L.) e bactérias presentes no solo podem abrir importantes perspectivas para o incremento da produtividade desta cultura (BOBATO, 2006; MEENA *et al.*, 2013; MONTAÑEZ; SICARDI, 2013). Alguns gêneros de bactérias associadas a raízes podem modificar sua morfologia radicular, bem como o diâmetro médio das raízes devido à produção de substâncias promotoras de crescimento, como citocinina, zeatina, giberilina (CASSÁN *et al.*, 2009) e ácido indol acético (MONTAÑEZ *et al.*, 2012; FARINA *et al.*, 2012). Além da produção de hormônios, a produção de enzimas e de sideróforos pode acarretar na supressão de microrganismos fitopatogênicos ou deletérios e, desta forma, também auxiliar na promoção do crescimento vegetal de maneira indireta (CAMPO; HUNGRIA, 2007; MARÍN-BRUZOS *et al.*, 2013). Há bactérias que podem beneficiar indiretamente o crescimento vegetal por meio de biocontrole de fitopatógenos que afetam o desenvolvimento da planta. Em culturas como tomate (SILVA *et al.*, 2008), soja, feijão e algodão (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009) já são descritas ações de bactérias que reduzem o crescimento de microrganismos em plantas, mostrando que o antagonismo pode beneficiar o desenvolvimento vegetal.

Considerando a limitação de métodos fenotípicos, técnicas moleculares como o sequenciamento da região do DNA codificante para o RNA ribossômico 16S (gene *16S rRNA*), são acessadas para uma identificação mais precisa do germoplasma microbiano (ATKINS; CLARK, 2004). Como ocorre colonização diferencial de bactérias na raiz do milho em contato direto com o solo (IKEDA *et al.*, 2013), torna-se importante a identificação taxonômica que sinalize grupos com ação específica, capazes de promover crescimento e fitossanidade vegetal. Portanto, o objetivo do trabalho foi identificar os gêneros dos isolados bacterianos por meio de sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* e caracterizá-los como potenciais promotores de crescimento vegetal por meio de testes *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

## Material Biológico

As nove bactérias foram selecionadas a partir de uma coleção de 150 isolados bacterianos. Eles foram obtidos de raízes de diferentes genótipos de milho, os quais correspondem a pares heteróticos e seus respectivos híbridos comerciais desenvolvidos pela empresa Semilia Genética e Melhoramento Ltda (IKEDA, 2010). As bactérias estão depositadas no acervo biológico de microrganismos da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética, LABGEM da UFPR. A seleção foi realizada por critério de qualidade do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* e desempenho dos isolados nos testes *in vitro* para promoção de crescimento e antagonismo por cultura pareada contra fungos isolados de lesões foliares de milho.

## Extração de DNA e Reação de Sequenciamento

O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Para o sequenciamento do gene *16S rRNA* foram utilizados na primeira PCR os *primers* fD1 e rD1 (Quadro 01) nas condições descritas por Menna *et al.* (2006). Os produtos da PCR foram purificados com acetato de amônio 7,5 M e a concentração do DNA foi verificada em espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> 2000. A reação de sequenciamento foi realizada com os *primers* fD1, 362f e 786f (Quadro 01) nas condições descritas por Menna *et al.* (2006). A purificação do DNA foi feita por Sephadex<sup>™</sup> G-50 DNA e a eletroforese capilar foi realizada em sequenciador automático de DNA modelo *MegaBACE<sup>™</sup> 1000 DNA Analysis Systems*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>	<b>Referência</b>
fD1 <sup>1,2</sup>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
rD1 <sup>1</sup>	AAGGAGGTGATCCAGCC	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
362f <sup>2</sup>	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	CRUZ (2001)
786f <sup>2</sup>	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	CRUZ (2001)

QUADRO 01 – PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR<sup>1</sup> E NO SEQUENCIAMENTO<sup>2</sup> DO GENE *16S rRNA*

A verificação da qualidade e edição das sequências foram feitas no programa *phred* (ERWING; GREEN, 1998; ERWING *et al.*, 1998). As sequências foram comparadas no *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Do banco de dados *StrainInfo* (DAWYNDDT *et al.*, 2005) foram obtidas as *type strains* e as sequências em formato fasta foram retiradas do GenBank (BENSON *et al.*, 2013) disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). No programa MAFFT version 7 (KATOHI; STANDLEY, 2013) as sequências foram alinhadas, a escolha do modelo evolutivo (K2+G) foi determinado pelo programa Mega5 (TAMURA *et al.*, 2010) e a construção da árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança foi realizada no programa GARLI – *Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference* (ZWICKL, 2006) com 2000 *bootstraps* e visualização pelo programa FigTree v 1.4.0 (RAMBAUT, 2012).

### **Avaliação da Promoção de Crescimento Vegetal**

Para avaliação da promoção de crescimento vegetal foram realizados os testes *in vitro* de produção de sideróforos, solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio, produção de enzimas e de ácido indol acético. As linhagens foram aplicadas em sementes de milho híbrido para avaliação do hipocótilo e da raiz.

O teste de produção de sideróforos foi realizado em meio sólido (SCHWYN; NEILANDS, 1987) e o teste de solubilização de fosfato sofreu adaptações do protocolo de Chagas Junior *et al.* (2010) com meio de cultura GL. Em ambos, o resultado positivo foi revelado pela formação de halo ao redor da colônia.

O teste de fixação biológica de nitrogênio foi adaptado de Araújo *et al.* (2004) com crescimento dos isolados em meio semi-sólido JNFb e resultado positivo observado pela formação de película na superfície do meio de cultura.

Os testes enzimáticos para amilase, celulase, lipase, pectinase, protease, quitinase e urease foram desenvolvidos segundo Cattelan (1999). A produção de ácido indol acético foi realizada segundo Kuss *et al.* (2007) com adaptação do meio de cultura para DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JÚNIOR; VICTOR, 1986). As absorbâncias foram transformadas para valores expressos em µg/mL (KUSS *et al.*, 2007). A análise estatística de comparação de médias pelo teste de Tukey (5%) foi executada no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002).

O teste de germinação das sementes utilizou sementes de milho híbrido comercial SX2530 cedidas pela Semilia Genética e Melhoramento Ltda, previamente desinfestadas segundo Shiomi, Melo e Minhoni (2008). Elas foram inoculadas com suspensão bacteriana de  $10^8$ /mL previamente centrifugada, o sobrenadante descartado e a massa celular ressuspensa em solução salina 85%. Para controle negativo, as sementes foram inoculadas apenas com solução salina estéril. A germinação ocorreu em B.O.D. a 28 °C em papel filtro umedecido com água destilada durante sete dias (RAS, 2009). As avaliações de comprimento (cm) e volume ( $\text{cm}^3$ ) de raiz e hipocótilo foram medidas (CASSÁN *et al.*, 2009) utilizando-se o *software* Win-rhizo v. 4.0, (Regent Systems, Quebec, Canadá). As análises estatísticas foram executadas no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002) com teste de Tukey a 5 % de significância.

### **Antagonismo a Fungos**

Para o teste de antagonismo de cultura pareada os nove isolados bacterianos foram testados frente a seis fungos isolados de lesões em folhas de milho: *Alternaria* sp. (LGMF1021), *Colletotrichum graminicola* (LGMF1044), *Fusarium verticillioides* (LGMF1046), *Cercospora* sp. (LGMF1047), *Bipolaris* sp. (LGMF1048) e *Diaporthe* sp. (LGMF1054). O crescimento do fungo foi medido a partir de um disco de micélio colocado na mesma placa do isolado bacteriano em teste. A inibição do crescimento do fungo foi avaliada por medições do raio do micélio crescido após sete dias, em comparação com o controle contendo apenas o micélio do fungo crescido sem o isolado bacteriano. O teste foi conduzido de acordo com Shiomi, Melo e Minhoni (2008) em triplicata. As análises estatísticas foram executadas no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002) com comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 150 isolados, foram identificados preliminarmente os seguintes gêneros: *Achromobacter* sp. (1 isolado), *Bacillus* sp. (43 isolados), *Burkholderia* sp. (7

isolados), *Enterobacter* sp. (4 isolados), *Klebsiella* sp. (2 isolados), *Paenibacillus* sp. (3 isolados), *Pantoea* sp. (15 isolados), *Pseudomonas* sp. (1 isolado), *Shigella* sp. (1 isolado), *Stenotrophomonas* sp. (2 isolados). Para o restante dos isolados, as sequências produzidas não foram suficientes para identificação de gênero.

Os nove isolados foram selecionados com base na qualidade das sequências obtidas de tamanhos acima de 500 pb. Assim, o sequenciamento do gene 16S *rRNA* que resultou em fragmentos de 560 a 1290 pb, revelou os gêneros: *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp., *Paenibacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Shigella* sp., destacando o fato de que dentre estes nove isolados avaliados, sete gêneros diferentes foram identificados (Figura 01).

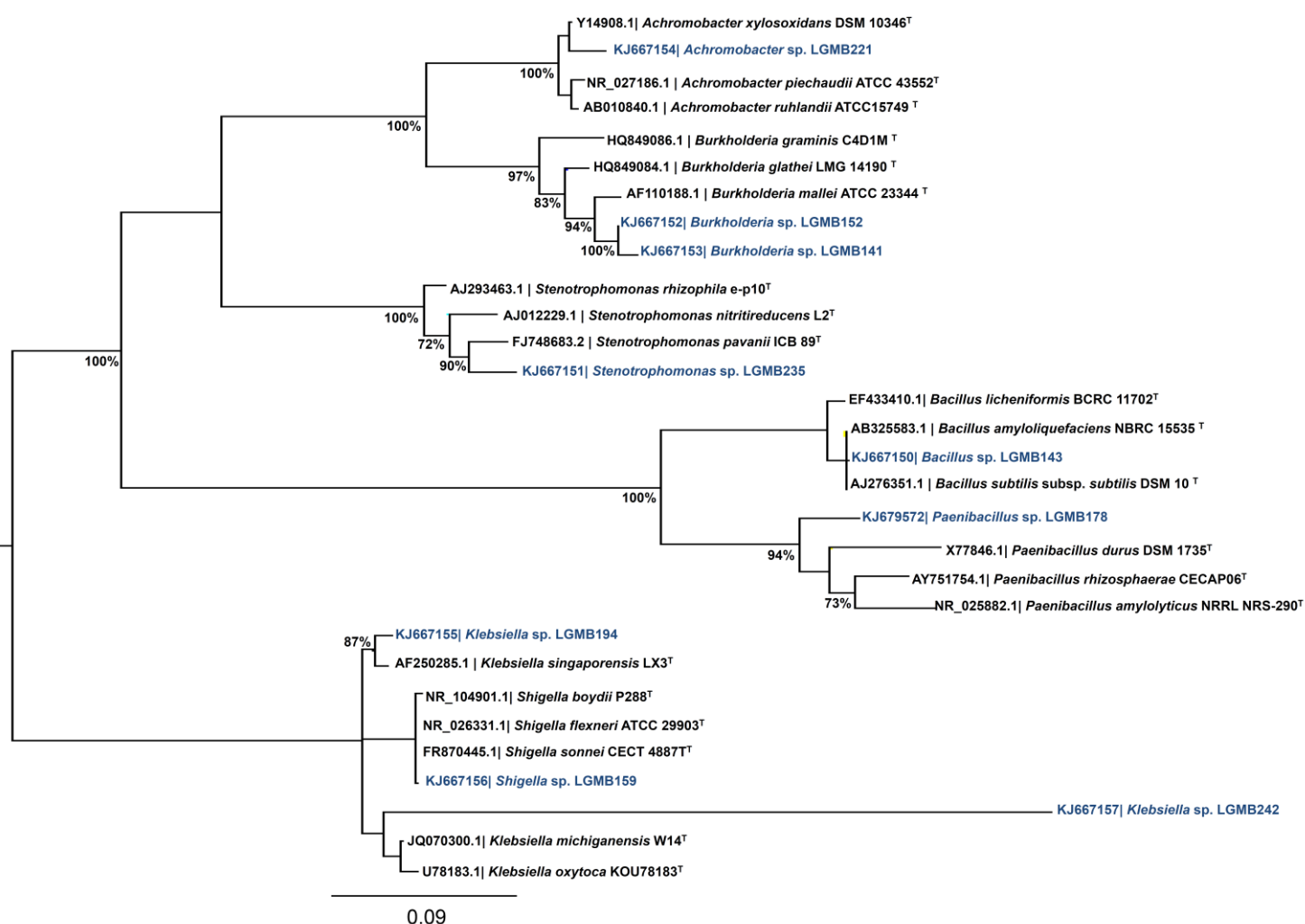


FIGURA 01 – Árvore gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança baseada em sequências parciais do gene 16S *rRNA* de isolados bacterianos de raízes de milho.

O primeiro código é de acesso ao GenBank ou NCBI *Reference Sequence* seguido da espécie e do código da espécie tipo. O código LGMB corresponde aos isolados da coleção do LABGEM, UFPR e apenas os valores de *bootstrap* acima de 70% estão representados.

Os resultados decorrentes dessa diversidade bacteriana concordam com os resultados de Triplett e Chelius (2001); Roesch *et al.* (2008) e Ikeda *et al.* (2013) que também encontraram diversidade bacteriana entre isolados de raízes de milho, com potencial de promoção de crescimento em plantas. A utilização de *type strains* na construção da árvore filogenética deu suporte à identificação em nível de gênero dos isolados bacterianos (WEISBURG *et al.*, 1991; TORRES *et al.*, 2008; MENNA *et al.*, 2006). De fato, estudos filogenéticos de sequências conservadas do gene *16S rRNA* configuram uma importante ferramenta molecular na identificação taxonômica.

É importante ressaltar que alguns gêneros encontrados também são descritos como bactérias patogênicas humanas e por esta razão torna-se fundamental sua identificação em nível de espécie. Entretanto, cuidados com a manipulação microbiana preventiva sempre são prioritários, uma vez que *a priori* pode ser desconhecida a vasta diversidade bacteriana em comunidades acessadas do solo (BENAMI *et al.*, 2013).

O isolado LGMB152 *Burkholderia* sp., gênero originalmente classificado como *Pseudomonas* sp. (YABUUCHI *et al.*, 1992) apresentou o melhor desempenho nos testes relacionados à produção de enzimas, sendo positivo para seis do total de testes conduzidos (Tabela 01). Esse resultado indicou que o presente material possivelmente desempenha uma atividade enzimática sobre fitopatógenos que acometem o milho. Sendo assim, o isolado LGMB152 mostrou-se promissor para o controle biológico de fungos uma vez que produziu metabólitos com ação fungicida.

LGMB152 *Burkholderia* sp. foi a bactéria mais antagônica contra os fungos isolados de lesões foliares do milho, com as melhores porcentagens de inibição do crescimento fúngico e diferença estatística (Tabela A do apêndice) para: *Fusarium verticillioides* (LGMF1046), *Cercospora* sp. (LGMF1047), *Bipolaris* sp. (LGMF1048) e *Diaporthe* sp. (LGMF1054) (Tabela 02).

Bevivino e colaboradores (1998) também observaram resultados de antagonismo de linhagens de *Burkholderia cepacia* contra *Fusarium* spp., que dependendo da espécie, podem atacar a cultura do milho causando podridão do colmo, da ponta da espiga e produzir toxinas. É importante salientar que o mecanismo de inibição pode estar associado à produção de metabólitos como enzimas líticas que destroem componentes celulares de fungos fitopatogênicos.

TABELA 01 – RESULTADOS QUANTITATIVOS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA) E QUALITATIVOS PARA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN), SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO, PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS E DE ENZIMAS POR BACTÉRIAS IDENTIFICADAS POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S *rRNA*

Isolado	ID 16S <i>rRNA</i>	AIA µg/mL	FBN	Sideróforo	Solubilização Fosfato	Amilase	Celulase	Lipase	Pectinase	Protease	Quitinase	Urease
LGMB 141	<i>Burkholderia</i> sp	2,16 <sup>d</sup>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
LGMB 143	<i>Bacillus</i> sp	25,75 <sup>a</sup>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
LGMB 152	<i>Burkholderia</i> sp	2,54 <sup>d</sup>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
LGMB 159	<i>Shigella</i> sp	13,43 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LGMB 178	<i>Paenibacillus</i> sp	7,29 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LGMB 194	<i>Klebsiella</i> sp	6,74 <sup>c</sup>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
LGMB 221	<i>Achromobacter</i> sp	7,29 <sup>c</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
LGMB 235	<i>Stenotrophomonas</i> sp	14,24 <sup>b</sup>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
LGMB 242	<i>Klebsiella</i> sp	7,59 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

FONTE: A autora (2013)

Segundo Harsh *et al.* (2006), além da produção de substâncias que conduzem ao incremento da taxa de crescimento vegetal, algumas bactérias atuam como inibidoras de fitopatógenos por meio de competição por nutrientes, exclusão de nicho, indução de resistência sistêmica e produção de metabólitos antifúngicos. Segue como segundo melhor isolado antagonista aos fungos testados, o LGMB143 *Bacillus* sp., testado contra *C. graminicola* (LGMF1044), *Fusarium verticillioides* (LGMF1046) e *Diaporthe* sp. (LGMF1054) (Tabela 02 e Tabela A do apêndice). Fungos de diversas espécies de *Fusarium* e o *C. graminicola* são causadores de fitopatologias, como por exemplo, podridão do colmo e antracnose, que causam lesões de tecido em entrenós e necrose no colmo (WORDELL FILHO; SPAGNOLLO, 2013).

Bactérias do gênero *Bacillus* são relatadas como produtoras de metabólitos com potencial inibidor de fungos como *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. (KUMAR; DUBEY, 2012), *Cercospora sojina* (SIMONETTI *et al.*, 2012), *Fusarium graminearum* e *Bipolaris sorokiniana* (SHALI *et al.*, 2010). Destaca-se assim, a importância do isolamento e da identificação de bactérias com potencial

biocontroladoras com vistas à redução do uso de fungicidas em culturas agrícolas como o milho.

TABELA 02 – RESULTADOS DO ANTAGONISMO DE CULTURA PAREADA DAS NOVE BACTÉRIAS CONTRA SEIS FUNGOS ISOLADOS DE LESÕES EM FOLHAS DE MILHO, REPRESENTADOS EM PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO

Isolado	ID 16S rRNA	LGMF1021 <i>Alternaria</i> sp.	LGMF1044 <i>Colletotrichum</i> <i>graminicola</i>	LGMF1046 <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i>	LGMF1047 <i>Cercospora</i> sp.	LGMF1048 <i>Bipolaris</i> sp.	LGMF1054 <i>Diaporthe</i> sp.
LGMB141	<i>Burkholderia</i> sp	63,91	50,98	52,56	75,71	3,58	12,18
LGMB143	<i>Bacillus</i> sp	59,66	67,65	60,05	66,26	38,48	62,23
LGMB152	<i>Burkholderia</i> sp	63,91	48,04	58,80	78,41	74,29	62,23
LGMB159	<i>Shigella</i> sp	63,91	55,88	32,58	52,77	29,29	27,29
LGMB178	<i>Paenibacillus</i> sp	19,32	52,94	25,09	48,72	34,80	41,45
LGMB194	<i>Klebsiella</i> sp	55,41	72,55	27,59	67,61	13,68	35,79
LGMB221	<i>Achromobacter</i> sp	61,78	74,51	16,35	77,06	50,41	32,01
LGMB235	<i>Stenotrophomonas</i> sp	66,03	40,20	18,85	50,07	29,29	5,57
LGMB242	<i>Klebsiella</i> sp	66,03	53,92	23,85	64,91	48,58	33,90

FONTE: A autora (2013)

A análise quantitativa da produção de auxina também revelou importante variação entre os isolados sendo o LGMB143 *Bacillus* sp. o maior produtor de AIA (25,75 µg/mL) seguido dos isolados LGMB235 *Stenotrophomonas* sp. (14,24 µg/mL) e LGMB159 *Shigella* sp. (13,43 µg/mL) (Tabela 01). Mesmo com alta produção de auxina (2,16 µg/mL a 25,75 µg/mL), os isolados mais produtivos não apresentaram efeito promotor de crescimento significativo no comprimento e no volume de raiz e hipocótilo das sementes germinadas (Tabela 03).

Em um estudo com *Bacillus* sp., Araújo e Guerreiro (2010) observaram que a maioria dos isolados que promoveram crescimento em milho não são os maiores produtores *in vitro* de AIA, uma vez que a adição de auxina microbiana pode alterar o nível ótimo da auxina endógena e causar inibição do crescimento da planta. Sendo assim, para cada cepa bacteriana que interage com a planta, haverá um limiar de ação da produção e utilização do AIA.

TABELA 03 – RESULTADOS ESTATÍSTICOS PARA AVALIAÇÃO DE COMPRIMENTO E VOLUME DE RAIZ E HIPOCÓTILO DE SEMENTES DO HÍBRIDO SX2530 INOCULADAS COM BACTÉRIAS

Isolado	ID 16S rRNA	Comprimento de raiz (cm)	Volume de raiz (cm <sup>3</sup> )	Comprimento de hipocótilo (cm)	Volume de hipocótilo (cm <sup>3</sup> )
<b>CONTROLE</b>	Sem bactéria	372,128 <sup>b</sup>	1,936 <sup>bc</sup>	718,953 <sup>b</sup>	23,509 <sup>b</sup>
<b>LGMB141</b>	<i>Burkholderia</i> sp	42,158 <sup>f</sup>	0,477 <sup>g</sup>	563,362 <sup>cd</sup>	15,179 <sup>c</sup>
<b>LGMB143</b>	<i>Bacillus</i> sp	370,139 <sup>b</sup>	2,108 <sup>b</sup>	299,678 <sup>ef</sup>	8,352 <sup>e</sup>
<b>LGMB152</b>	<i>Burkholderia</i> sp	145,735 <sup>e</sup>	1,261 <sup>e</sup>	364,627 <sup>e</sup>	12,876 <sup>d</sup>
<b>LGMB159</b>	<i>Shigella</i> sp	136,012 <sup>e</sup>	0,907 <sup>f</sup>	237,299 <sup>f</sup>	2,125 <sup>f</sup>
<b>LGMB178</b>	<i>Paenibacillus</i> sp	261,802 <sup>cd</sup>	1,687 <sup>d</sup>	492,494 <sup>d</sup>	15,987 <sup>c</sup>
<b>LGMB194</b>	<i>Klebsiella</i> sp	63,321 <sup>f</sup>	0,900 <sup>f</sup>	576,597 <sup>c</sup>	16,549 <sup>c</sup>
<b>LGMB221</b>	<i>Achromobacter</i> sp	225,643 <sup>d</sup>	1,350 <sup>e</sup>	875,893 <sup>a</sup>	31,320 <sup>a</sup>
<b>LGMB235</b>	<i>Stenotrophomonas</i> sp	296,496 <sup>c</sup>	1,859 <sup>cd</sup>	262,297 <sup>f</sup>	7,288 <sup>e</sup>
<b>LGMB242</b>	<i>Klebsiella</i> sp	467,923 <sup>a</sup>	2,611 <sup>a</sup>	350,447 <sup>e</sup>	11,431 <sup>d</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey,  $p < 0,05$ . A análise das médias foi realizada independentemente para cada tratamento.

FONTE: A autora (2013).

Para incremento de comprimento e volume de raiz avaliado na germinação das sementes, o isolado LGMB242, *Klebsiella* sp. promoveu incremento de cerca de um quarto no volume de raiz (25,74%) e de um terço no comprimento (34,86%) em comparação com o controle. Para o hipocótilo, o isolado LGMB221, *Achromobacter* sp. foi quem apresentou melhor resultado aumentando 21,82% o comprimento e 33,23% o volume. Harsh e colaboradores (2006) verificaram que alguns isolados microbianos são capazes de produzir bioestimulantes, como auxinas, a partir de precursores existentes nas raízes de plantas, o que indica a existência de comunicação entre planta e microrganismos na produção de exsudados.

De acordo com Benite e Machado (2002) aspectos estruturais e funções biológicas dos sideróforos estão sendo amplamente estudadas em *Pseudomonas* spp. Bactérias do gênero *Bacillus* sp. são conhecidas como produtoras de sideróforos e podem ter papel importante como biofertilizantes para aumento da concentração de micronutrientes em grãos em culturas como o milho. Cinco isolados apresentaram resultado positivo para a produção de sideróforos: LGMB141 *Burkholderia* sp., LGMB143 *Bacillus* sp., LGMB152 *Burkholderia* sp., LGMB221 *Achromobacter* sp. e LGMB235 *Stenotrophomonas* sp., revelando que as condições do solo podem estar auxiliando na captação de ferro para disponibiliza-lo à planta.

Esta característica não é inerente a todas as bactérias. Portanto, esse resultado representa um importante diferencial de atividade desses cinco isolados como promotores de crescimento. Neste caso, pela assimilação ou sequestro do ferro de fitopatógenos que o usam no seu metabolismo. A análise *in vivo* poderá dimensionar seu real efeito direto na planta.

## **CONCLUSÕES**

Foram identificados nove isolados bacterianos provenientes de milho com potencial biotecnológico de promoção de crescimento e biocontrole de fitopatologias. Os potenciais promotores de crescimento vegetal foram: LGMB221, *Achromobacter* sp. e LGMB242, *Klebsiella* sp. por seu desempenho promissor já no estágio inicial do desenvolvimento das plântulas de milho. Os potenciais biocontroladores foram: LGMB143, *Bacillus* sp. e LGMB152, *Burkholderia* sp., a partir do seu desempenho nos testes enzimáticos, de antagonismo e produção de sideróforos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Semília – Genética e Melhoramento Ltda pelo fornecimento dos materiais vegetais. O trabalho foi parcialmente apoiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CNPq-Microrganismos Facilitadores (557746/2009-4) e CNPq-Repensa (562008/2010-1).

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 837-844, 2010.
- ARAÚJO, L.M.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**. v.155, n.6, p. 491-495, 2004.
- ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.5, p.503-510, 2009.
- ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v.45, p.3-15, 2004.
- BENAMI, M.; GROSS, A.; HERZBERG, M.; ORLOFSKY, E.; VONSHAK, A.; GILLOR O. Assessment of pathogenic bacteria in treated graywater and irrigated soils. **Science of the Total Environment**. v. 458-460, P. 298-302, 2013.
- BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P. Sideróforos: “Uma resposta dos Microrganismos”. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1155-1164, 2002.
- BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J., OSTELL, J.; SAYERS, E.W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v.41, D36-42, 2013.
- BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **Microbial Ecology**, v.27, p.225-237, 1998.
- 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.

CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII da Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. EMBRAPA Soja, Londrina, 2007, 212p.

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.

CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. EMBRAPA Soja, Londrina, 1999, 36p.

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.

CRUZ, L. M. **Caracterização e Análise Filogenética Molecular de Novos Isolados Fixadores de Nitrogênio**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; De MEYER, H.; SWINGS, J. Knowledge accumulation and resolution of data inconsistencies during the integration of microbial information sources. **IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering**, v.17, n.8, p.1111-1126, 2005.

ERWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

ERWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B. de; LISBOA, B. B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P.. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v.55, p.44–52, 2012.

HARSH, P.B.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.233-266, 2006.

IKEDA, A.C.; **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

IKEDA, A.; BASSANI, L.L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V.K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M.B.R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L.V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v.65, p.154-160, 2013.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.772-780, 2013.

KUMAR, P.; DUBEY, R.C. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v.167, p.493-499, 2012.

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.

MARÍN-BRUZOZ, M.; WONG, I.; MENA, J.; MORÁN, R.; PIMENTEL, E.; SÁNCHEZ, I.; BASULTO, R.; MOREIRA, R. *Zea mays* L. plant growth promotion by *Tsukamurella paurometabola* strain C-924. **Biotechnology Applied**, v.30, p.105-110, 2013.

MEENA, M. D.; TIWARI, D. D.; CHAUDHARI, S. K.; BISWAS, D. R.; NARJARY, B.; MEENA, A. L.; MEENA, B. L.; MEENA, R. B. Effect of biofertilizer and nutrient levels on yield and nutrient uptake by maize (*Zea mays* L.). **Annals of Agricultural and Biology Research**, v.18, p.176-181, 2013.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

MONTAÑEZ, A.; BLANCOB, A.R.; BARLOCCOA, C.; BERACOCHEAA, M.; SICARDIA, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, v 58, p.21–28, 2012.

MONTAÑEZ, A.; SICARDIA, M. Effects of inoculation on growth promotion and biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) under greenhouse and field conditions. **Basic Research Journals of Agricultural Science and Review**, p.103-109, 2013.

RAMBAUT, A. **Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2006-2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>

RAS – Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, MAPA/ACS, 399 p. 2009.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* PV. Citro tipo B. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.

ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v.302, p.91-104, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SHALI, A.; GHASEMI, S.; AHMADIAN, G.; RANJBAR, G., DEHESTANI, A.; KHALESI, N.; MOTALLEBI, E.; VAHED, M. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. **Phytoparasitica**, v.38, p.141-147, 2010.

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v.9, p.535-538, 2008.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.4, p.1062-1072, 2008.

SIMONETTI, E.; CARMONA, M.A.; SCANDIANI, M.M.; GARCÍA, A.F.; LUQUE, A.G.; CORREA, O.S.; BALESTRASSE, K.B. Evaluation of indigenous bacterial strains for biocontrol of the frog-eye leaf spot of soya bean caused by *Cercospora sojina*. **Letters in Applied Microbiology**, v.55, p.170–173, 2012.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0, 2010.

TORRES, A.R.; ARAÚJO, W.L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTTEGHER, F.; MOSTASSO, F.L. AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic Enterobacteria associated with different host plants. **The Journal of Microbiology**, v.46, n.4, p.1-8, 2008.

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

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

WORDELL FILHO, J.A.; SPAGNOLLO, E. Sistema de cultivo e doses de nitrogênio na sanidade e no rendimento do milho. **Ciência Rural**, v.43, n.2, p.199-205, 2013.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v.36, p.1251-1275, 1992.

ZWICKL, D.J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.** (Ph.D. dissertation) The University of Texas at Austin, 2006.

## 4 CAPÍTULO 2

### **Avaliação da atividade promotora de crescimento vegetal e identificação de bactérias visando seleção de estirpes para produção de inoculantes**

#### **RESUMO**

O nitrogênio é um elemento essencial na cultura de milho e a busca por alternativas de fornecimento desse nutriente ao solo, como inoculantes bacterianos, é favorável à diminuição do impacto ambiental e dos custos ao produtor. De uma coleção de 173 isolados bacterianos provenientes de raízes de milho (*Zea mays* L.) foram selecionadas bactérias que apresentaram resultados positivos nos testes *in vitro* de promoção de crescimento. Doze apresentaram atividade de produção de sideróforos e ácido indol acético (AIA), fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato. A produção de AIA foi quantificada, e o isolado LGMB322 apresentou-se como maior produtor (39,1 µg/mL). Os isolados foram inoculados em dois híbridos de milho (ATL100 e KWX628) para avaliações biométricas. Após 35 dias de crescimento em casa de vegetação, foram avaliadas as variáveis: número de folhas (nº/planta), diâmetro do colmo (mm), altura (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>), comprimento radicular (cm), massa da raiz seca (g), massa da folha seca (g), nitrogênio e fósforo foliar (mg/g). O sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* revelou que os isolados estão classificados entre os gêneros descritos como promotores de crescimento vegetal: *Enterobacter* sp.; *Klebsiella* sp. e *Pantoea* sp. Em ambos os híbridos foram observados efeitos favoráveis de promoção de crescimento, destacando-se o isolado LGMB208 para o híbrido ATL100 e os isolados LGMB125, LGMB225, LGMB239 e LGMB274 para o híbrido KWX628. Esses isolados representam uma perspectiva real e vantajosa para a produção de inoculantes comerciais.

## INTRODUÇÃO

A cultura do milho constitui matéria-prima para uma série de produtos que representam aproximadamente 70% de sua produção no Brasil e no mundo. O nitrogênio é um elemento limitante na formação da biomassa e, por esta razão, a adubação nitrogenada permite que as plantas expressem seu potencial de crescimento. O uso de inoculantes possibilita incrementar a produtividade na lavoura, aumentar a qualidade dos solos, reduzir custos para o produtor e diminuir o impacto ambiental. Ele é composto por microrganismos que atuam em etapas do crescimento da planta, havendo bactérias específicas para cada espécie vegetal (EMBRAPA, 2009).

O primeiro inoculante comercial para milho foi composto de estirpes de *Azospirillum brasilense* que, além de realizar fixação biológica do nitrogênio, promove o crescimento das plantas por meio da produção de substâncias que estimulam o crescimento radicular e conseqüentemente aumento da absorção de água e nutrientes (HUNGRIA *et al.*, 2010). Portanto, existe uma alternativa real de incremento do pacote tecnológico de culturas importantes como o milho, pela adição de bactérias capazes de promover crescimento vegetal.

O gênero *Azospirillum* spp. compreende rizobactérias que se associam a gramíneas e fixam nitrogênio atmosférico em condições microaeróbias. Também, a família Enterobacteriaceae contém espécies rizosféricas diazotróficas, como: *Klebsiella* spp.; *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. (KENNEDY; CHOUDHURY; KEESKES, 2004). Dentre os grupos de bactérias promotoras de crescimento vegetal são encontrados alguns isolados de solo pertencentes a gêneros dessa família, como por exemplo: *Pantoea* spp. e *Serratia* spp. (HAYAT *et al.*, 2010).

Bactérias com ação promotora de crescimento vegetal são denominadas PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria* (KLOEPPER; SCHROTH, 1978). Elas atuam por mecanismos de ampliação da disponibilidade de nutrientes e da produção de fitormônios, ou de redução da atividade de fitopatógenos, controlando organismos deletérios por atividade biopesticida. As substâncias produzidas pelas PGPBs podem afetar o crescimento por modificações na morfologia ou fisiologia das raízes, aumentando a área superficial e a taxa de respiração, que influencia na captação de nutrientes e crescimento da planta (BEATTIE, 2006).

Algumas bactérias podem melhorar a nutrição vegetal fornecendo nutrientes específicos, principalmente ferro e fósforo por meio da produção de sideróforos e solubilização de fosfatos inorgânicos, respectivamente (GALVÃO *et al.* 2010). Também, alguns isolados bacterianos são capazes de produzir auxinas como o ácido indol acético (AIA), que exerce efeitos benéficos na planta como o incremento radicular, desenvolvimento de órgãos, aumento de germinação e do rendimento de culturas (DEY *et al.*, 2004). As bactérias fixadoras de nitrogênio interagem com raízes de plantas e auxiliam na ciclagem de nutrientes, além de contribuírem com nitrogênio em culturas de gramíneas representando economia nos custos de produção (MOREIRA *et al.*, 2010).

Estudos relatam a ação de promoção de crescimento por rizobactérias (PENG *et al.*, 2009) e ação de biocontrole de doenças e proteção contra estresse (BERG *et al.*, 2010) em diversas plantas. Essa ação ocorre dependendo da interação de genótipos da planta e da bactéria (COELHO *et al.*, 2007; SABINO, 2007), uma vez que a qualidade dos exsudados radiculares pode determinar a preferência das bactérias por determinadas espécies e cultivares (NEHL; ALLEM; BROWN, 1997). Existem evidências de que estirpes bacterianas são capazes de promover crescimento vegetal em plantas de milho e apresentam diferenças de desempenho entre seus isolados (HUNGRIA, 2011). Chaiharn e Lumyong (2011) ressaltam que isolados bacterianos tem potencial para biofertilizante vegetal como promotores de crescimento, mas que ainda são necessárias investigações da eficácia *in situ*, uma vez que existem inúmeras interações entre a planta e microrganismos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar parâmetros vegetais de promoção de crescimento no milho, a partir de diferenças de desempenho entre isolados bacterianos e posterior seleção das que apresentam alto potencial para produção de inoculantes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Biológico**

Foram avaliadas bactérias de uma coleção composta por 173 isolados (141 obtidos por IKEDA, 2010 e 32 isolados por BASSANI, 2009) quanto à atividade *in vitro* de promoção de crescimento. Todas foram obtidas de raízes de diferentes genótipos de milho e pertencem ao acervo biológico da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética, LABGEM da UFPR. Toda a coleção é proveniente de isolamento a campo de plantas cujos pares heteróticos incluem linhagens parentais homozigotas e seus correspondentes híbridos comerciais (IKEDA *et al.*, 2013).

As bactérias isoladas de sete diferentes genótipos de milho foram selecionadas e inoculadas em sementes dos híbridos: ATL100 e KWX628, escolhidos por seu contraste genético. O material vegetal foi desenvolvido e cedido pela empresa Semilia Genética e Melhoramento Ltda localizada em Campo Largo, Paraná.

### **Caracterização da Atividade Promotora de Crescimento**

Para avaliação da promoção de crescimento vegetal foram realizados os testes *in vitro* de produção de sideróforos, produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio. Para avaliar a FBN pela nitrogenase, foi realizada amplificação do gene *nifH*. Os 173 isolados foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfatos e produção de sideróforos. Da resposta positiva de 93 isolados para ambos os parâmetros, foi testada a produção de AIA e atividade de FBN resultando em um total final de 12 isolados.

O teste de produção de sideróforos foi realizado em meio sólido (SCHWYN; NEILANDS, 1987) e o resultado positivo foi revelado pela presença de halo ao redor da colônia.

A produção de ácido indol acético foi realizada segundo Kuss *et al.* (2007), com adaptação do meio de cultura para DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JÚNIOR; VICTOR, 1986). As absorbâncias obtidas a 600 nm foram transformadas em valores expressos como  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O teste de solubilização de fosfato foi realizado com adaptações do protocolo de Chagas Junior *et al.* (2010) com meio de cultura GL e o resultado positivo foi observado pela formação de halo translúcido ao redor da colônia.

O teste de fixação biológica de nitrogênio foi adaptado de Araújo *et al.* (2004) com crescimento dos isolados em meio semi-sólido JNFb e resultado positivo observado pela formação de película na superfície do meio de cultura.

A amplificação do gene *nifH* foi feita por PCR com os *primers* nifH-F (5'-AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC-3') e nifH-R (5'-TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT-3') em condições descritas por Rösch, Mergel e Bothe (2002), sendo o resultado positivo a visualização de banda com aproximadamente 700 pb em gel de agarose 1,0%.

### **Experimento em Casa de Vegetação**

Os doze isolados bacterianos foram semeados em meio Luria Bertani e a concentração de células foi ajustada para  $10^8$  células/mL. As sementes de milho foram submetidas ao teste de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS, 2009) e desinfestação de acordo com Shiomi, Melo e Minhoni (2008) antes de serem inoculadas em vasos de Leonard contendo solução nutritiva estéril para plantas (BROUGHTON; DILWORTH, 1971). O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 15 tratamentos: 12 isolados bacterianos, a cepa padrão Ab-V05 de *Azospirillum brasilense*, controle sem nitrogênio, controle com nitrogênio, e quatro repetições por cada uma das duas variedades de milho, totalizando 120 vasos (15 x 4 x 2). Em cada vaso foram semeadas três sementes, para desbaste após sete dias, mantendo-se duas plantas por vaso.

Foi inoculado 0,5 mL de solução bacteriana por semente. No vaso de Leonard, a solução inicial recebeu adição da metade de nitrogênio recomendado para cultura de milho juntamente com solução de fósforo (50 mL por vaso de 4,07 g  $H_4CaO_8P_2.H_2O$  em 1 L de água destilada). Os vasos foram mantidos em temperatura média de 28 °C durante 35 dias. Após esse período, foi realizada avaliação biométrica das plantas com régua para altura (cm) e paquímetro digital para diâmetro do colmo (mm). O número de folhas por planta foi contabilizado e a área foliar ( $cm^2$ ) foi avaliada no aparelho Area Meter LI-COR® Biosciences modelo LI-3100C. O volume e o comprimento radicular foram avaliados no aparelho Winrhizo® v.4.0. As amostras das partes aérea e radicular foram submetidas à

temperatura de 60 °C em estufa de secagem durante 48 h e pesagem após obtenção de peso constante. As avaliações da quantidade de nitrogênio e fósforo contida nas folhas (mg/g) foram realizadas pela EMBRAPA Soja, no Laboratório de Biotecnologia de Solos após a secagem e pesagem das folhas.

Os parâmetros biométricos de massa da parte aérea seca (g), volume radicular (cm<sup>3</sup>) e nitrogênio total (mg/g) foram avaliados de acordo com recomendações do Anexo da Instrução Normativa SDA 13 de 25/03/2011 e o restante dos parâmetros foram avaliados por representarem características de indicação de crescimento vegetal. As análises estatísticas foram executadas no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002) com teste de Tukey  $p < 0,05$ .

### Caracterização Molecular

O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Para o sequenciamento do gene *16S rRNA* foram utilizados na primeira PCR os *primers* fD1 e rD1 (Quadro 01) nas condições descritas por Menna *et al.* (2006). Os produtos da PCR foram purificados com as enzimas Exo 01 e Fast AP (*ThermoScientific kit*). A reação de sequenciamento foi realizada com os *primers* fD1, 362f e 786f (Quadro 01) nas condições descritas por Menna *et al.* (2006). A purificação do DNA foi feita por Sephadex™ G-50 DNA, e a eletroforese capilar foi realizada em sequenciador automático de DNA modelo *ABI PRISM 3500 Genetic Analyser*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>	<b>Referência</b>
fD1 <sup>1,2</sup>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
rD1 <sup>1</sup>	AAGGAGGTGATCCAGCC	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
362f <sup>2</sup>	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	CRUZ (2001)
786f <sup>2</sup>	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	CRUZ (2001)

QUADRO 01 – PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR<sup>1</sup> E NO SEQUENCIAMENTO<sup>2</sup> DO GENE *16S rRNA*

A verificação da qualidade e edição das sequências foram feitas no programa *phred* (ERWING; GREEN, 1998; ERWING *et al.*, 1998). As sequências foram comparadas no *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Do banco de dados *StrainInfo* (DAWYNDDT *et al.*, 2005) foram obtidas as *type strains* e as sequências em formato *fasta* foram retiradas do GenBank (BENSON *et al.*, 2013)

disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram alinhadas no programa MAFFT version 7 (KATO; STANDLEY, 2013) e a escolha do modelo evolutivo (HKY) foi realizada no programa Mega5 (TAMURA *et al.*, 2010). A construção da árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança foi realizada no programa GARLI – *Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference* (ZWICKL, 2006) com 2000 *bootstraps* e visualização pelo programa FigTree v1.4.0 (RAMBAUT, 2012).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No fluxograma apresentado na figura 01 é possível observar que em uma primeira etapa 173 isolados foram testados para atividade promotora de crescimento *in vitro*. Destes, 70,5% produzem sideróforos e 56,5% solubilizaram fosfato, sendo 93 isolados com resposta positiva para ambos os parâmetros. A partir deste número, foram avaliadas a atividade de fixação biológica de nitrogênio (63,4%) e a produção de ácido indol acético (12,9%), resultando em doze isolados capazes de resposta positiva para todas as variáveis testadas.

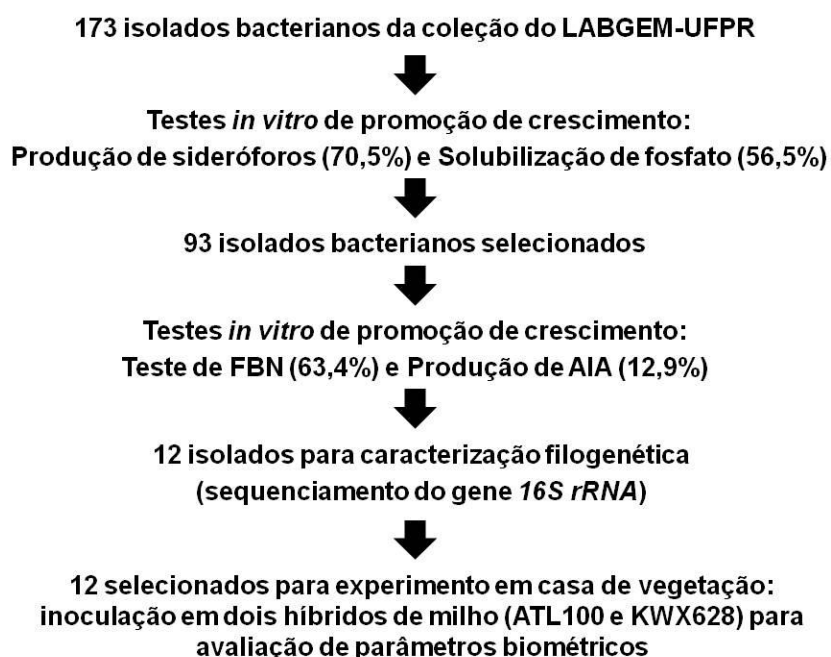


FIGURA 01 – Fluxograma dos experimentos para seleção dos isolados a partir de 173 bactérias avaliadas.  
FONTE: A autora (2014)

A produção de sideróforos foi significativa, pois 122 isolados apresentaram resposta positiva na avaliação preliminar. Este é um dado relevante, considerando-se que o ferro é um importante cofator de enzimas que participam de diversas rotas bioquímicas de processos fisiológicos na planta, tais como respiração, fotossíntese e fixação biológica de nitrogênio (GALVÃO *et al.* 2010). Esse grande número de isolados observado é importante no contexto de promoção de crescimento, uma vez que eles podem atuar diretamente na disponibilização de ferro para a planta e indiretamente na antibiose a microrganismos fitopatogênicos, menos eficientes quanto ao metabolismo desse elemento. Dessa forma, fornecem um efeito protetor à planta (CAMPO; HUNGRIA, 2007).

Quanto à solubilização de fosfato, também houve resultado positivo em mais da metade dos isolados testados (56,5%). Os resultados indicaram que uma porção significativa da coleção de bactérias testadas, possui real capacidade de incrementar a nutrição vegetal pela disponibilização do fósforo por meio de solubilização de fosfato inorgânico (GALVÃO *et al.* 2010). De fato, Campo e Hungria (2007) observaram que 20 a 80% do fósforo contido no solo apresentam-se na forma orgânica, sendo que sua disponibilidade é dependente de microrganismos. O restante do fósforo encontra-se na forma inorgânica, que não é prontamente disponível às plantas. Assim, os isolados solubilizadores de fosfato observados neste teste foram comprovadamente eficientes no fornecimento do fósforo à planta. Ainda, outro aspecto relevante é a atuação fundamental deste elemento na fixação biológica do nitrogênio (FBN).

Na sequência, 63,4% dos isolados apresentaram resultado positivo na avaliação da atividade *in vitro* de FBN. Isso indicou que sua atuação na promoção do crescimento vegetal poderia estar ocorrendo pela disponibilização do nitrogênio. Outro indicativo da atividade de FBN foi a grande porcentagem de resultados positivos para o teste *in vitro* em meio semi-sólido. As condições metodológicas da técnica de amplificação do *nifH* não foram suficientes para detectar a existência da enzima nitrogenase envolvida na atividade de FBN. Entretanto, a atividade fisiológica relacionada ao incremento de nitrogênio nas plantas inoculadas pode também estar associada a isolados com capacidade diazotrófica. Para esse conjunto de amostras, a característica de degeneração do *primer* pode ter sido um fator de interferência no resultado da amplificação, uma vez que inúmeros *primers*

desenhados para acessar esse gene e análises *in silico*, já demonstraram que tanto *primers* universais quanto específicos podem não apresentar cobertura satisfatória das sequências *nifH* (GABY; BUCKLEY, 2012).

O indicativo de FBN manifestado nos isolados deste trabalho é de relevância especial para a cultura do milho, uma vez que cálculos da contribuição de nitrogênio fixado para gramíneas estão em torno de 25 a 50 kg N/ha/ano. Este dado equivale a um suprimento médio de 17% desse elemento (MOREIRA *et al.*, 2010). Considerando-se também que os sistemas agrícolas são, na sua maioria, dependentes de adubação química, o presente resultado representa o potencial do uso desses isolados tanto para incremento nas taxas de FBN quanto para promoção de crescimento vegetal. A ação prática de utilização destas bactérias é o uso de protocolos formais para a produção de inoculantes. E este produto também representa significativa redução dos altos custos de produção normalmente exigidos por esta cultura.

Os 12 isolados com resultado positivo para produção de ácido indol acético representam 12,9% do total de isolados testados. De acordo com Chaiarn e Lumyong (2011) rizobactérias produtoras de ácido indol acético são facilmente isoladas do solo para utilização na agricultura como biofertilizantes. O AIA pode estimular processos de alongamento, divisão e diferenciação celular e sua produção está associada à resposta aos exsudados, ricas fontes de triptofano, produzidos pela rizosfera vegetal.

Observou-se nestes resultados, que a produção *in vitro* deste fitormônio é inerente a cada cepa bacteriana e sua quantidade real produzida é dependente da interação entre planta e bactéria. Os dados de produção quantitativa de cada isolado estão apresentados no Gráfico 01. O isolado LGMB322 destacou-se como maior produtor de AIA, seguido dos isolados LGMB228 e LGMB319. Entretanto, a alta produção desse hormônio, não correspondeu a um efeito estatisticamente significativo da auxina no incremento radicular.

Este efeito tem sido identificado pelo conseqüente aumento da superfície de absorção de nutrientes quando cepas produtoras de AIA são inoculadas no milho. Por outro lado, há evidências de que existe um limiar de produção de AIA, de modo que altas taxas desse fitormônio podem afetar o crescimento das raízes (ARRUDA, 2012).

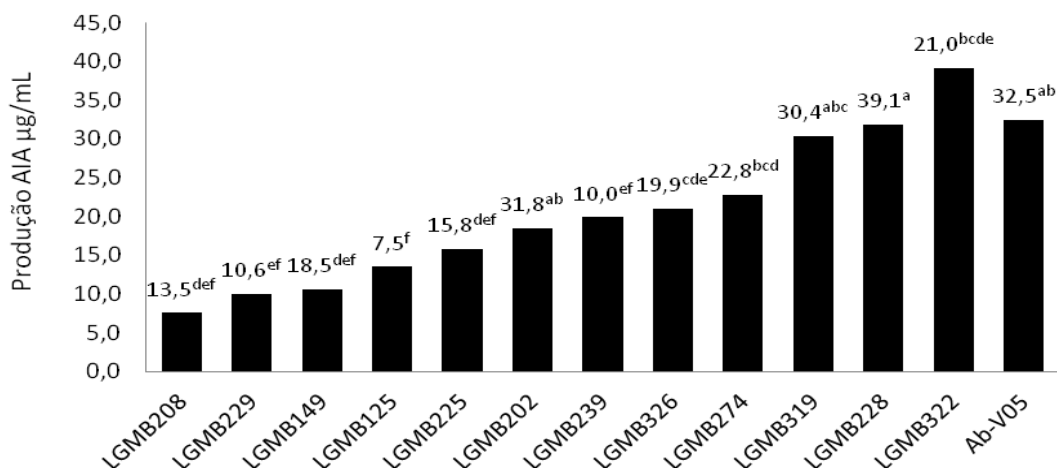


GRÁFICO 01 – RESULTADOS QUANTITATIVOS DA PRODUÇÃO DE AIA

As medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey  $p < 0,05$ .  
 FONTE: a autora (2014)

O sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* resultou em fragmentos de 100 a 900 pb o que reduziu a precisão da identificação dos gêneros de alguns dos isolados. Análises de genes *housekeeping* como *recA*, *atpD*, *rpoB*, *gyrB*, em análise MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) podem fornecer dados complementares para a identificação filogenética de bactérias até nível de espécie, por exemplo (RIBEIRO *et al.*, 2013). No presente conjunto de isolados, foram observados os gêneros *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pantoea* sp. e *Stenotrophomonas* sp. (Figura 02).

Representantes desses gêneros são descritos na literatura como benéficos na interação planta-bactéria como, por exemplo, Peng *et al.* (2009) que encontraram representantes de *Enterobacter* spp. como promotoras de crescimento em arroz selvagem e Berg *et al.* (2010) que encontraram espécies do gênero *Stenotrophomonas* sp. como promotoras de crescimento, protetoras contra estresse ambiental e biocontroladoras de doenças em diversas plantas.

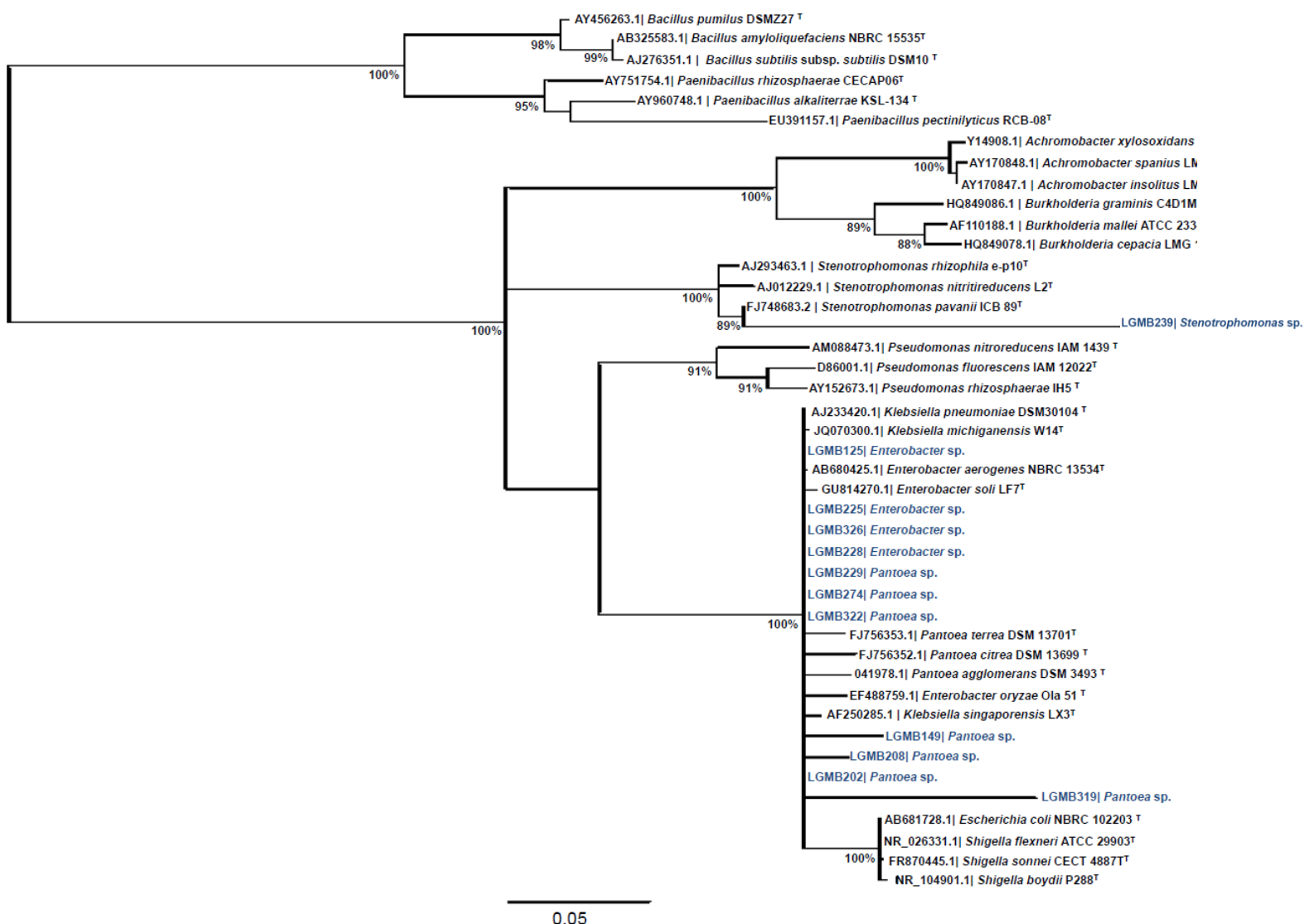


FIGURA 02 – Árvore gerada a partir da análise de Máxima Verossimilhança baseada em seqüências parciais do gene 16S rRNA de isolados bacterianos de raízes de milho.

O primeiro código é de acesso ao GenBank ou NCBI *Reference Sequence* seguido da espécie e do código da espécie tipo. O código LGMB corresponde aos isolados da coleção do LABGEM, UFPR e apenas os valores de *bootstrap* acima de 70% estão representados.

Para a avaliação bactéria x planta foi observado 91,6% de germinação das sementes do híbrido ATL100 e 98,3% de KWX628, indicando que os resultados da inoculação com bactérias não foi afetada pela viabilidade das sementes. Os resultados das avaliações biométricas dos dois híbridos inoculados pelos 12 isolados encontram-se nas Tabelas 02 e 03 para os híbridos ATL100 e KWX628, respectivamente.

TABELA 02 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DAS AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS DAS PLANTAS DE MILHO HÍBRIDO ATL100 INOCULADAS COM ISOLADOS BACTERIANOS PROMISSORES PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL, CONTROLE NEGATIVO (SEM NITROGÊNIO) E CONTROLES POSITIVOS: INOCULANTE COMERCIAL *Azospirillum brasilense* V05 (Ab-V05) E ADUBAÇÃO NITROGENADA (COM NITROGÊNIO).

Tratamento	Número folhas por planta	Diâmetro do colmo (mm)	Altura até último nó (cm)	Área foliar total (cm <sup>2</sup> )	Comprimento radicular total (cm)	Volume radicular total (cm <sup>3</sup> )	Massa total da raiz seca (g)	Massa total da folha seca (g)	Nitrogênio total das folhas (mg/g)	Fósforo total das folhas (mg/g)
LGMB125	8,00 a	7,56 ab	20,95 ab	630,13 a	29,46 a	24,29 ab	1,46 ab	2,37 a	21,51 abc	5,41 a
LGMB149	8,25 a	7,77 ab	21,14 ab	658,62 a	28,43 a	23,88 ab	1,37 ab	2,73 a	22,01 ab	5,41 a
LGMB202	7,88 a	7,73 ab	20,70 ab	608,63 a	36,41 a	23,70 ab	1,48 ab	2,53 a	19,23 bcde	4,86 ab
LGMB208	8,13 a	8,04 a	20,86 ab	542,18 ab	31,99 a	23,14 ab	1,66 a	2,82 a	22,27 ab	5,24 a
LGMB225	8,00 a	7,65 ab	19,43 b	638,66 a	33,51 a	21,07 ab	1,38 ab	2,31 a	20,50 abcde	4,74 ab
LGMB228	8,00 a	8,11 a	21,91 ab	759,57 a	29,64 a	19,46 ab	1,45 ab	2,93 a	19,43 abcde	4,26 bc
LGMB229	7,75 a	8,24 a	22,16 ab	732,02 a	32,27 a	24,06 ab	1,72 a	3,00 a	17,83 de	4,31 bc
LGMB239	8,13 a	8,13 a	22,49 ab	731,59 a	28,72 a	21,02 ab	1,49 ab	2,82 a	14,34 f	4,60 ab
LGMB274	8,00 a	7,86 ab	23,09 a	692,16 a	27,09 a	23,27 ab	1,48 ab	2,70 a	17,35 ef	4,32 bc
LGMB319	7,88 a	7,73 ab	21,80 ab	667,00 a	32,22 a	27,95 a	1,49 ab	2,53 a	21,43 abcd	5,35 a
LGMB322	8,00 a	7,64 ab	21,49 ab	687,22 a	27,00 a	25,43 ab	1,40 ab	2,72 a	22,40 ab	4,99 ab
LGMB326	7,75 a	7,85 ab	22,11 ab	702,58 a	30,16 a	28,47 a	1,71 a	2,81 a	22,38 ab	4,63 ab
Ab-V05	7,75 a	7,80 ab	21,13 ab	681,82 a	32,27 a	27,00 ab	1,55 ab	2,53 a	17,90 cde	4,63 ab
Com N	7,75 a	6,56 ab	20,20 ab	647,66 a	29,98 a	23,20 ab	1,36 ab	2,27 a	23,22 a	5,01 ab
Sem N	6,63 b	5,96 b	14,31 c	258,74 b	28,47 a	16,15 b	1,13 b	1,13 b	3,39 g	3,72 c

As medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey  $p < 0,05$ . A análise das médias foi realizada independentemente para cada variável.  
 FONTE: A autora (2014)

TABELA 03 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA DAS AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS DAS PLANTAS DE MILHO HÍBRIDO KWX628 INOCULADAS COM ISOLADOS BACTERIANOS PROMISSORES PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL, CONTROLE NEGATIVO (SEM NITROGÊNIO) E CONTROLES POSITIVOS: INOCULANTE COMERCIAL *Azospirillum brasilense* V05 (Ab-V05) E ADUBAÇÃO NITROGENADA (COM NITROGÊNIO).

Tratamento	Número folhas por planta	Diâmetro do colmo (mm)	Altura até último nó (cm)	Área foliar total (cm <sup>2</sup> )	Comprimento radicular total (cm)	Volume radicular total (cm <sup>3</sup> )	Massa total da raiz seca (g)	Massa total da folha seca (g)	Nitrogênio total das folhas (mg/g)	Fósforo total das folhas (mg/g)
LGMB125	6,75 ab	6,57 ab	17,63 ab	426,14 a	25,35 ab	13,65 abc	0,83 a	1,31 a	20,76 a	4,40 cd
LGMB149	7,25 a	6,87 ab	18,33 ab	474,46 a	27,20 ab	18,34 abc	1,04 a	1,51 a	18,32 abcd	4,57 bcd
LGMB202	7,25 a	6,86 ab	17,73 ab	489,19 a	20,87 ab	15,09 abc	1,01 a	1,40 a	16,99 abcd	4,60 abcd
LGMB208	7,00 ab	6,60 ab	17,24 ab	441,73 a	23,89 ab	16,84 abc	0,97 a	1,23 a	16,65 abcd	4,48 bcd
LGMB225	7,38 a	7,29 a	18,21 ab	577,71 a	28,87 a	16,77 abc	1,09 a	2,00 a	15,79 abcd	5,35 a
LGMB228	7,25 a	6,02 ab	18,85 ab	407,47 a	20,84 ab	10,83 bc	0,77 a	1,14 a	16,13 abcd	4,79 abc
LGMB229	7,00 ab	7,06 ab	18,70 ab	546,25 a	25,91 ab	20,36 ab	1,16 a	1,99 a	13,67 cd	5,17 ab
LGMB239	7,75 a	7,88 a	19,86 a	674,48 a	26,95 ab	24,31 a	1,40 a	2,64 a	15,47 bcd	5,11 abc
LGMB274	7,38 a	7,00 ab	18,93 ab	481,60 a	27,29 ab	17,33 abc	1,04 a	1,67 a	18,69 ab	4,02 d
LGMB319	7,38 a	7,07 ab	18,54 ab	489,73 a	24,02 ab	17,83 abc	1,03 a	1,63 a	15,44 bcd	4,87 abc
LGMB322	7,50 a	6,91 ab	18,59 ab	576,60 a	22,41 ab	16,23 abc	0,96 a	1,93 a	18,48 abc	4,52 bcd
LGMB326	7,25 a	6,98 ab	18,71 ab	507,96 a	26,71 ab	16,11 abc	1,00 a	1,65 a	13,60 d	4,53 bcd
Ab-V05	7,50 a	6,73 ab	17,23 ab	486,31 a	20,25 b	15,98 abc	0,89 a	1,78 a	15,32 bcd	4,71 abcd
Com N	7,38 a	6,53 ab	16,90 b	416,66 a	23,73 ab	12,65 abc	0,84 a	1,30 a	15,60 abcd	4,92 abc
Sem N	6,13 b	5,19 b	11,85 c	153,66 b	23,01 ab	9,93 c	0,81 a	1,25 a	2,94 e	4,88 abc

As medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey p<0,05. A análise das médias foi realizada independentemente para cada variável.  
 FONTE: A autora (2014)

Em ambas as tabelas observou-se claramente uma tendência de incremento no desenvolvimento da planta pelo efeito positivo da inoculação dos isolados previamente selecionados. Entretanto, houve algumas diferenças de desempenho entre os híbridos.

Na Tabela 02, observou-se que para o híbrido ATL100, a testemunha sem nitrogênio apresentou sempre um valor menor ou no máximo estatisticamente igual aos isolados para todas as variáveis, exceto para o comprimento radicular. Embora não hajam muitos relatos na literatura que utilizem a variável altura até o último nó (cm), ela se mostrou aqui como parâmetro discriminador entre os tratamentos na avaliação do desenvolvimento vegetal. Além dela, as variáveis de número de folhas, área e massa foliar seca apontaram superioridade para todos os demais tratamentos em relação à testemunha sem nitrogênio, indicando que a inoculação destes isolados é vantajosa para os híbridos testados. É importante salientar que, em condições de campo, não se exclui a aplicação de nitrogênio para o início do desenvolvimento do milho (HUNGRIA, 2011).

Para as variáveis: diâmetro do colmo, altura, volume e massa radicular seca, e quantidade de fósforo nas folhas, observou-se que todos os tratamentos são superiores ou iguais à testemunha com nitrogênio, fato que demonstra inequivocamente o alto desempenho dos isolados quando comparados ao tratamento com a adubação nitrogenada. O mesmo foi observado com relação à cepa comercial Ab-V05, destacando-se os isolados LGMB149, LGMB208, LGMB322 e LGMB326 como superiores na análise do nitrogênio foliar. Isso é um indicativo de que diferentes cepas podem desenvolver interações de promoção de crescimento no milho com ainda melhor desempenho frente aos inoculantes disponíveis no mercado.

Também, o isolado LGMB326 foi superior em volume e massa da raiz seca na comparação com a cepa comercial e às testemunhas com e sem nitrogênio. Isso demonstrou que o incremento do sistema radicular pode, sim, possibilitar maior absorção de água e nutrientes para planta, conferindo melhores condições para o crescimento vegetal.

Os maiores teores de fósforo nas folhas foram observados pela inoculação dos isolados LGMB125, LGMB149, LGMB208 e LGMB319. Eles apresentaram de 13 a 17% de aumento quando comparados ao padrão comercial (Ab-V05) e de 4 a 8% com

relação à testemunha com nitrogênio. Como o fósforo desempenha importante papel no suprimento de energia para a planta e sua disponibilidade depende da solubilização de fosfatos inorgânicos por bactérias que interagem com a rizosfera vegetal (CHAIHARN; LUMYONG, 2011), esse incremento de fósforo foliar pode estar associado à atividade solubilizadora dos isolados em destaque. Observou-se ainda que dois deles apresentaram resultados superiores para outros parâmetros: LGMB208 para diâmetro do colmo e massa da raiz seca, e o LGMB319 para volume radicular. Deste modo, os melhores resultados de crescimento foram observados na inoculação do isolado LGMB208 (Figura 03).

Quanto ao teor de nitrogênio nas folhas, houve tratamentos estatisticamente iguais à testemunha com nitrogênio e quatro isolados superiores à cepa comercial. Isto indicou que para este híbrido testado, existem isolados capazes de superar o desenvolvimento estimulado pela adubação química e pelo inoculante comercial. Essa observação também representa um ponto de partida para novas investigações com um espectro maior de híbridos comerciais, visando desenvolver um inoculante contendo linhagens bacterianas potencialmente melhores que as vigentes no mercado.

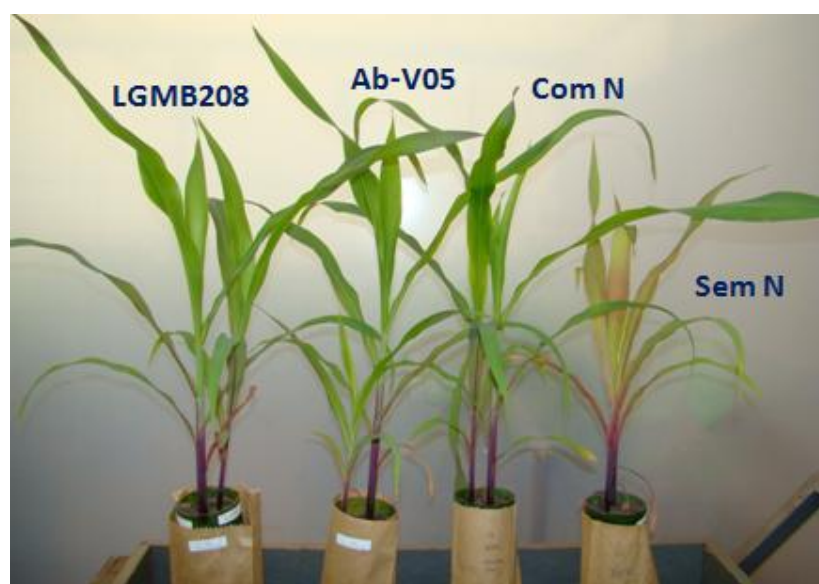


FIGURA 03 – Híbrido ATL100, em cada vaso de Leonard há duas plantas. Da esquerda para direita: inoculação com a bactéria LGMB208, controle com cepa comercial Ab-V05 (*Azospirillum brasilense*), controle positivo com nitrogênio e sem bactéria e controle negativo sem nitrogênio e sem bactéria.

Na Tabela 03, observou-se o resultado da inoculação no híbrido KWX628. A testemunha sem nitrogênio apresentou valores menores ou iguais a todos os tratamentos, exceto para massa da raiz seca e massa das folhas secas. Esses parâmetros, apesar de amplamente descritos na literatura como indicadores de crescimento vegetal, não foram discriminatórios para as plantas inoculadas nesse experimento. Já o parâmetro de altura de cada planta mostrou-se discriminatório para avaliação do crescimento, pois todos os tratamentos foram superiores tanto para a testemunha com nitrogênio quanto para a sem nitrogênio. Para essa variável, a maioria dos isolados apresentou resultado estatisticamente igual à cepa comercial Ab-V05, com exceção do isolado LGMB239 que foi ainda superior na altura até o último nó e em volume radicular.

Para a quantidade de fósforo nas folhas, o isolado LGMB225 também foi superior tanto à cepa comercial quanto às testemunhas com e sem nitrogênio. Como sua disponibilidade auxilia em diversos processos bioquímicos na planta, as bactérias que proporcionam maiores quantidades de fósforo, especialmente pela solubilização de fosfatos, conferem vantagens ao desenvolvimento da planta (GALVÃO *et al.*, 2010).

Para o teor de nitrogênio nas folhas, foi notório o isolado LGMB125 que se destacou com 35% de incremento com relação à cepa comercial e 33% a mais que a testemunha com nitrogênio. Também, o isolado LGMB274 mostrou-se superior à cepa comercial em 22%. Esse resultado é muito significativo, pois pode estar associado à atividade de FBN. Sabe-se que bactérias associativas excretam parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada, suprimindo parcialmente suas necessidades. Neste trabalho, todos os isolados apresentaram indicação de atividade fixadora de nitrogênio e isso, associado ao aumento de fósforo e potássio, poderá efetivamente contribuir para o aumento da produtividade do milho (HUNGRIA, 2011). Aqui, os benefícios da inoculação destas bactérias em plantas de milho corresponderam a um aumento significativo da taxa de nitrogênio que pode ser decorrente da FBN, associado à promoção de crescimento vegetal.

Para área foliar, todos os tratamentos foram superiores apenas à testemunha sem nitrogênio. Para número de folhas, diâmetro do colmo, comprimento e volume radicular e teor de fósforo nas folhas, os tratamentos quando não foram superiores,

mostraram-se iguais aos tratamentos com e sem nitrogênio. Isto já indica que houve seleção favorável, pois supre tanto à demanda do nitrogênio inorgânico, quanto do inoculante já disponível no mercado. Quanto à altura e teor de nitrogênio nas folhas, todos os tratamentos foram superiores ao controle sem nitrogênio. Importante salientar que para a quantidade de nitrogênio nas folhas, LGMB125 foi estatisticamente superior tanto à testemunha sem nitrogênio quanto à cepa comercial.

Os melhores resultados de crescimento do híbrido KWX628 foram observados na inoculação dos isolados LGMB125, LGMB225, LGMB239 e LGMB274 (Figura 04). Assim como para o híbrido ATL100, os resultados também são promissores para o híbrido KWX628, já que para ambos existem isolados com alto potencial de promoção de crescimento frente à adubação nitrogenada e ao inoculante comercializado para o milho.

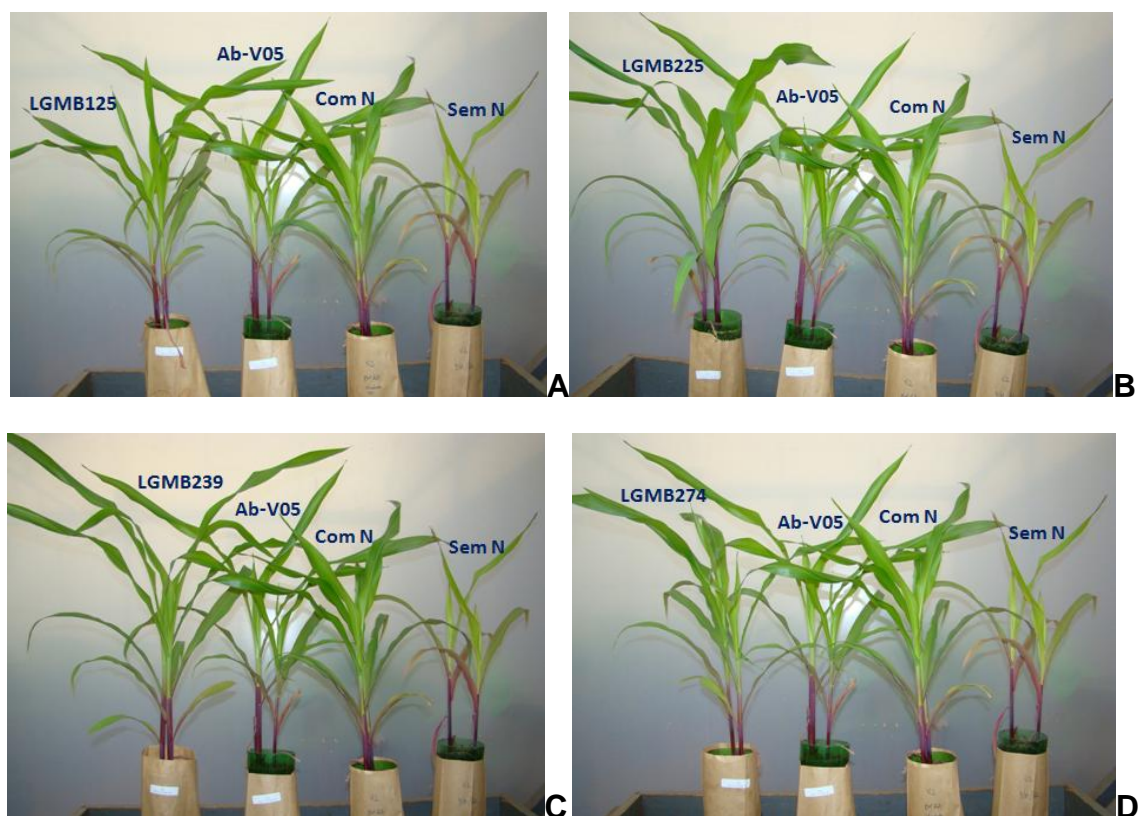


FIGURA 04 – Híbrido KWX628, em cada vaso de Leonard há duas plantas. Em todas as figuras, da esquerda para direita: inoculação com a bactéria testada, controle com cepa comercial Ab-V05 (*Azospirillum brasilense*), controle positivo com nitrogênio e sem bactéria e controle negativo sem nitrogênio e sem bactéria. **A.** Bactéria testada LGMB125. **B.** Bactéria testada LGMB225. **C.** Bactéria testada LGMB239. **D.** Bactéria testada LGMB274.

Neste trabalho os isolados bacterianos demonstraram diferentes desempenhos de interação dependente do genótipo da planta. De acordo com Coelho *et al.* (2007), o genótipo pode influenciar o estabelecimento desta interação e a especificidade hospedeira ocorre em diferentes espécies vegetais de interesse agrícola. No presente trabalho, essa diferença foi observada entre os dois híbridos, podendo ocorrer na associação dentro da mesma espécie para diferentes cultivares (SABINO, 2007). Apesar destas variações, observou-se sempre uma tendência de interação positiva dependente do genótipo da planta com os isolados bacterianos testados. Essa interação possivelmente é determinada pela secreção diferencial de exsudados radiculares de cada híbrido, pois a qualidade dos exsudados radiculares pode determinar a preferência das bactérias por determinadas espécies e cultivares (NEHL; ALLEM; BROWN, 1997).

Finalmente, pode-se concluir que o comportamento geral destas bactérias foi sempre no sentido de promover crescimento vegetal e que as mais promissoras deverão ser avaliadas quanto ao espectro de abrangência de híbridos em estudos que visam a produção de novas alternativas de inoculantes comerciais para o milho.

## **CONCLUSÕES**

Os isolados bacterianos provenientes de raízes de milho apresentaram alto potencial para promoção de crescimento vegetal.

Para o híbrido ATL100, o isolado LGMB208 demonstrou os melhores resultados nas avaliações biométricas. Para o híbrido KWX628, pelo menos quatro isolados, LGMB125, LGMB225, LGMB239 e LGMB274 foram superiores em experimento semelhante. Ainda, LGMB208 e LGMB225 podem estar associados à FBN devido a incrementos significativos no teor de N e simultâneo aumento na produção de fósforo.

Todos eles representam grande potencial para estudos que visem a produção de inoculantes comerciais.

## AGRADECIMENTOS

À Semília – Genética e Melhoramento Ltda, pelo fornecimento dos materiais vegetais. O trabalho foi parcialmente apoiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CNPq-Microrganismos Facilitadores (557746/2009-4) e CNPq-Repensa (562008/2010-1).

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, L.M.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**. v.155, n.6, p. 491-495, 2004.

ARRUDA, L.M. **Seleção e Caracterização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Milho Cultivadas no Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

BASSANI, L.L. Caracterização molecular de bactérias capazes de colonizar gramíneas em solo paranaense por meio de BOX-PCR. **Relatório de Iniciação Científica Voluntária**. 2009.

BEATTIE, G. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. **Biomedical and Life Sciences**, n.1, p.1-56, 2006.

BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J., OSTELL, J.; SAYERS, E.W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v.41, D36-42, 2013.

BERG, G.; EGAMBERDIEVA, D.; LUGTENBERG, B.; HAGEMANN, M. Symbiotic Plant – Microbe Interactions: Stress Protection, Plant Growth Promotion, and Biocontrol by *Stenotrophomonas*. **Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology**, v.18, p.445-460, 2010.

BROUGHTON, W.J.; DILWORTH, M.J. Control of Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. **Biochemical Journal**, p.1075-1080, 1971.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII da Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. EMBRAPA Soja, Londrina, 2007, 212p.

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.

CHAIHARN, M.; LUMYONG. S. Screening and optimization of indole-acetic-acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. **Current Microbiology**, v.62, p.173-181, 2011.

COELHO, L.F.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; AMBROSANO, G.M.B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.6, p.1413-1420, 2007.

CRUZ, L. M. **Caracterização e Análise Filogenética Molecular de Novos Isolados Fixadores de Nitrogênio**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; De MEYER, H.; SWINGS, J. Knowledge accumulation and resolution of data inconsistencies during the integration of microbial information sources. **IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering**, v.17, n.8, p.1111-1126, 2005.

DEY, R.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v.159, p.371-394, 2004.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA MILHO E SORGO**, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br>.

ERWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

ERWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

GABY, J.C.; BUCKELY, D.H. A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase. **PLoS ONE**, n.7, n.7, 2012.

GALVÃO, P.G.; URQUIAGA, S.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **EMBRAPA Agroecologia**, Documentos 270, 2010. 63 p.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **American Microbiology**. v.60, p.579-598, 2010.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. **EMBRAPA Soja**. Documento 325, 2011. 36p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, p.413-425, 2010.

IKEDA, A.C.; **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

IKEDA, A.; BASSANI, L.L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V.K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M.B.R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L.V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v.65, p.154-160, 2013.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.772-780, 2013.

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.I.M.A.; KEESKES, M.L. Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, v.6, n.8, p.1229-1244, 2004.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. **Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria**, v.2, p.879-882, 1978.

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.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

MOREIRA, F.M.deS.; SILAVA, K da; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F.de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

NEHL, D.B.; ALLEM, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, n.1, p.1-20, 1997.

PENG, G.; ZHANG, W.; LUO, H.; XIE, H.; LAI, W.; TAN, Z. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild Rice species *Oryza latifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.1650-1655, 2009.

RAMBAUT, A. **Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2006-2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.

RAS – Regras para Análise de Sementes. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, MAPA/ACS, 399 p. 2009.

RIBEIRO, R.A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R.F.; GRAHAM, P.H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Research Microbiology**. v.164, n.7, p 740-748, 2013.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* PV. Citro tipo B. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.

RÖSCH, C.; MERGEL, A.; BOTHE, H. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.8, p.3818-3829, 2002.

SABINO, D.C.C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 9, p.535-538, 2008.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p.71-78, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0, 2010.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

ZWICKL, D.J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.** (Ph.D. dissertation) The University of Texas at Austin, 2006.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

Estudos de associação entre bactérias promotoras de crescimento vegetal e plantas são desenvolvidos visando a produção de inoculantes que podem reduzir o uso de agroquímicos. No presente trabalho, foram identificados alguns isolados bacterianos provenientes de raízes de milho com atividade de promoção de crescimento frente à adubação nitrogenada e à cepa do inoculante comercial para esta cultura. Esse resultado é de interesse aplicado, uma vez que o alto custo dos adubos nitrogenados e a contínua preocupação com efeitos deletérios relacionados ao excesso de nitrato no ambiente, são pontos relevantes no desenvolvimento de pesquisas sobre FBN e promoção de crescimento por bactérias. Isto representa um avanço na redução da dependência de fertilizantes nitrogenados (CONCEIÇÃO *et al.*, 2009).

Dentre os isolados testados neste trabalho, também foram observadas bactérias com ação antagônica a fungos isolados de folhas com lesões, possivelmente de ação fitopatogênica. Este antagonismo foi expresso pela atividade de inibição do crescimento de fungos por produção *in vitro* de compostos. É possível que essa ação seja mediada pela produção de enzimas apresentada por alguns dos isolados selecionados. Também, o antagonismo *in vivo* pode ocorrer por competição, pois alguns isolados apresentaram atividade de produção de sideróforos, queladores do ferro. Kupper, Gimenes-Fernandes e Goes (2003) destacam que na antibiose, os microrganismos tem amplo espectro de ação e a produção de substâncias tóxicas inibidoras de fungos são mais efetivos que qualquer outro mecanismo envolvido. Essas observações possibilitam a investigação de novas moléculas e sistemas que estejam envolvidos na expressão de genes de defesa contra fitopatógenos em plantas.

A partir dos experimentos em casa de vegetação, destacaram-se como promotoras de crescimento, bactérias inoculadas em duas variedades milho híbrido. Os isolados foram selecionados por testes específicos *in vitro*. As PGPBs constituem um grupo de microrganismos de efeito benéfico às plantas devido à capacidade de colonização na superfície e em tecidos internos da raiz. Assim, os isolados selecionados para inoculação nas plantas de milho correspondem a este grupo por

estimular o crescimento das plantas via fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de ácido indol acético e sideróforos. De modo geral o incremento no crescimento vegetal se dá pela combinação de todos esses mecanismos (HUNGRIA, 2011).

Algumas cepas bacterianas foram caracterizadas tanto para atividade antagônica contra fungos quanto para promoção de crescimento, como é o caso das cepas identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* sp.. Lanna Filho, Ferro e Pinho (2010) destacam o estudo com *Bacillus subtilis* como agente promotor de crescimento em plantas e/ou biocontrolador, capaz de ocupar diferentes nichos e apresentar versatilidade fisiológica. Nosso estudo demonstrou que as bactérias com ampla atividade benéfica para a planta, torna promissora a caracterização de microrganismos para produção de inoculantes e controle de doenças, buscando a redução do uso de produtos químicos que impactam o meio ambiente.

Hungria (2011) realizou experimentos com diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho, obtendo resultados de incremento no rendimento de grãos. Isso resultou da identificação de estirpes autorizadas para a produção do primeiro inoculante comercial para milho no Brasil. Dentre os isolados bacterianos testados neste trabalho, alguns apresentaram atividade de crescimento superior à cepa comercial utilizada para esta cultura. Observou-se ainda que os resultados foram diferentes para cada híbrido inoculado, sendo que ambos evidenciaram diferentes tendências de desempenho bacteriano, com resposta favorável ao crescimento vegetal nos dois híbridos testados.

A diferença de desempenho entre os isolados selecionados no experimento em casa de vegetação pode estar relacionada a diferentes níveis de interação entre as bactérias e a rizosfera vegetal. Esses sistemas são estabelecidos por exsudados secretados pela planta que atuam como sinalizadores para bactérias (HUNGRIA, 2011; NEHL; ALLEM; BROWN, 1997). Uma vez estabelecida essa interação, ocorre a diferenciação na arquitetura vegetal dependente dos genótipos da planta e da bactéria (SANTOS *et al.*, 2013).

A amplitude genética pode influenciar a interação do milho com bactérias quando, por exemplo, ocorre diferente resposta entre ambos quanto à produção de biomassa e incremento de teor de nitrogênio na parte aérea (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Portanto, a identificação da atividade promotora de crescimento vegetal desempenhada pelas bactérias neste trabalho, é um ponto de partida para novos estudos visando ampla resposta às cepas bacterianas selecionadas para produção de inoculantes comerciais.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

- Foram caracterizados filogeneticamente isolados bacterianos da coleção do LABGEM – UFPR com ação de promoção de crescimento em plantas de milho;
- Foram identificadas cepas dos gêneros *Achromobacter* sp. e *Klebsiella* sp. como promotores de crescimento;
- Encontrou-se isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp. identificados como biocontroladores;
- Foram observados isolados com resultados de crescimento significativamente superiores ao inoculante comercial para milho;
- Diferenças de especificidade entre variedades comerciais de híbridos de milho foram expressas na avaliação de promoção de crescimento das plantas;
- Embora hajam diferenças de especificidade, a tendência geral foi favorável na promoção de crescimento pelos isolados bacterianos que poderão ser testados com número maior de híbridos comerciais visando ampliar seu espectro de atuação.

## APÊNDICES

## RESULTADOS ESTATÍSTICOS PARA ANTAGONISMO

TABELA A. MÉDIAS DO CRESCIMENTO EM DIÂMETRO (cm) DOS SEIS FUNGOS ISOLADOS DE LESÕES EM FOLHAS DE MILHO TESTADOS EM ANTAGONISMO DE CULTURA PAREADA COM NOVE BACTÉRIAS

Isolado	ID 16S rRNA	LGMF1021 <i>Alternaria</i> sp.	LGMF1044 <i>Colletotrichum</i> <i>graminicola</i>	LGMF1046 <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i>	LGMF1047 <i>Cercospora</i> sp.	LGMF1048 <i>Bipolaris</i> sp.	LGMF1054 <i>Diaporthe</i> sp.
Controle	Sem bactéria	1,567 <sup>a</sup>	3,400 <sup>a</sup>	2,667 <sup>a</sup>	2,467 <sup>a</sup>	3,633 <sup>a</sup>	3,533 <sup>a</sup>
LGMB141	<i>Burkholderia</i> sp	0,567 <sup>cd</sup>	1,667 <sup>c</sup>	1,267 <sup>f</sup>	0,600 <sup>def</sup>	3,500 <sup>a</sup>	3,100 <sup>b</sup>
LGMB143	<i>Bacillus</i> sp	0,633 <sup>cd</sup>	1,100 <sup>d</sup>	1,067 <sup>f</sup>	0,833 <sup>cd</sup>	2,233 <sup>d</sup>	1,333 <sup>e</sup>
LGMB152	<i>Burkholderia</i> sp	0,567 <sup>cd</sup>	1,767 <sup>bc</sup>	1,100 <sup>f</sup>	0,533 <sup>f</sup>	0,933 <sup>f</sup>	1,333 <sup>e</sup>
LGMB159	<i>Shigella</i> sp	0,567 <sup>cd</sup>	1,500 <sup>c</sup>	1,800 <sup>e</sup>	1,167 <sup>b</sup>	2,567 <sup>c</sup>	2,567 <sup>c</sup>
LGMB178	<i>Paenibacillus</i> sp	1,267 <sup>b</sup>	1,600 <sup>c</sup>	2,000 <sup>cde</sup>	1,267 <sup>b</sup>	2,367 <sup>d</sup>	2,067 <sup>d</sup>
LGMB194	<i>Klebsiella</i> sp	0,700 <sup>c</sup>	0,933 <sup>d</sup>	1,933 <sup>de</sup>	0,800 <sup>cde</sup>	3,133 <sup>b</sup>	2,267 <sup>cd</sup>
LGMB221	<i>Achromobacter</i> sp	0,600 <sup>cd</sup>	0,867 <sup>d</sup>	2,233 <sup>b</sup>	0,567 <sup>ef</sup>	1,800 <sup>e</sup>	2,400 <sup>cd</sup>
LGMB235	<i>Stenotrophomonas</i> sp	0,533 <sup>d</sup>	2,033 <sup>b</sup>	2,167 <sup>bc</sup>	1,233 <sup>b</sup>	2,567 <sup>c</sup>	3,333 <sup>ab</sup>
LGMB242	<i>Klebsiella</i> sp	0,533 <sup>d</sup>	1,567 <sup>c</sup>	2,033 <sup>bcd</sup>	0,867 <sup>c</sup>	1,867 <sup>e</sup>	2,333 <sup>cd</sup>

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Teste de Tukey,  $p < 0,05$ . A análise das médias foi realizada independentemente para cada tratamento.

FONTE: A autora (2013)

## MATERIAL E MÉTODOS DETALHADOS

### MATERIAL BIOLÓGICO

As culturas de bactérias foram reativadas de amostras preservadas em água destilada esterilizada segundo Perin e Reis (1999), em meio sólido Nutriente Ágar para utilização nos testes *in vitro* para promoção de crescimento vegetal e caracterização filogenética.

Os isolados bacterianos pertencem ao acervo biológico de microrganismos da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética, LABGEM da UFPR e são provenientes de fragmentos radiculares de milho em experimento a campo, isolados de pares heteróticos que incluem linhagens parentais homozigotas e seus correspondentes híbridos comerciais (IKEDA *et al.*, 2013). Os cultivares de milho foram fornecidos pela Empresa Semília Genética e Melhoramento Ltda situada em Campo Largo – Paraná.

## CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA

### **Extração de DNA Genômico**

O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído pelo método clorofórmio-fenol de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) com adaptações: os isolados bacterianos foram crescidos em 1 mL de meio líquido NA (Peptona 3,2 g; Extrato de carne 3 g; Ágar 15 g; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 7,0) durante 24 h a 28 °C sob agitação de 120 rpm. As culturas foram centrifugadas a 10.000 g durante 2 min e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 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; SDS 1% pH 7,2) previamente aquecido em banho-maria a 60 °C. As amostras foram deixadas em vórtex horizontal a 120 rpm durante 5 min e incubadas em banho-maria 60 °C durante 20 min. Após este período, as amostras foram incubadas em gelo durante 10 min e centrifugadas a 10.000 g durante 10 min. Um mililitro do sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofane (1 parte de clorofórmio, CHCl<sub>3</sub> : 1 parte de fenol, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH). Os microtubos foram agitados por inversão e centrifugados durante 5 min a 10.000 g. Cerca de 90% da fase superior foram cuidadosamente transferidos para um novo microtubo e o mesmo volume de clorofil (24 partes de clorofórmio, CHCl<sub>3</sub> : 1 parte de álcool isoamílico, C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH), foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas por inversão

e centrifugadas por 5 min a 10.000 g. Novamente, 90% da fase superior foram transferidos para um novo microtubo e o mesmo volume de isopropanol foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas por inversão com breve agitação e centrifugadas por 20 min a 12.000 g. A fase aquosa foi vertida com cuidado e foram adicionados 500 µL de etanol 70%. Após agitar brevemente o microtubo e centrifugar durante 10 min a 12.000 g, a fase aquosa foi novamente vertida e os microtubos deixados em estufa a 37 °C durante 30 min. Após a completa secagem do microtubo, foram adicionados 50 µL de água ultra pura para ressuspender o DNA. Após 24 h, o DNA genômico obtido foi quantificado em aparelho NanoDrop® 2000 *Thermo Scientific* e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% com marcador de peso molecular Lambda *Hind III Gibco*® corado com GelRed® 100x e visualizado sob luz ultravioleta para fotodocumentação.

### Amplificação do gene 16S rRNA

Segundo Weisburg *et al.* (1991), o par de *primers* fD1/rD1 é considerado universal pois é capaz de amplificar uma grande variedade de taxa de bactérias, além disso há a perspectiva de ser amplificado um número máximo de nucleotídeos da região 16S do ribossomo. Na figura 01 pode-se observar a localização aproximada dos *primers* para amplificação do gene ribossomal 16S.

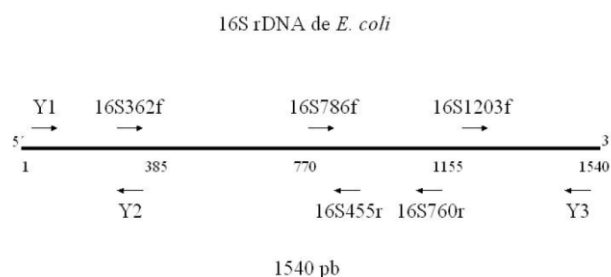


Figura 01 – Localização aproximada dos *primers* iniciadores para amplificação e sequenciamento do 16S com base no gene de *Escherichia coli*.

Fonte: <http://www.psb.ugent.be/rna/primers/bs/HTML>

Além dos *primers* universais fD1 e rD1, também podem ser usados os *primers* Y1 e Y3 para a primeira reação de amplificação do gene 16S rRNA (Quadro 01). Para a reação de sequenciamento do gene 16S rRNA foram necessários: 2 µL de dNTPs (0,2

Mm cada); 2,5 µL de tampão 1x (Tris-base 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5Mm); 0,5 µL de cada *primer* (0,2 mM cada); 0,125 µL de Taq DNA polimerase (1,25 U); 16,125 µL de água ultra pura esterilizada e 2,5 µL de DNA molde (20 ng) para um volume final de reação de 25 µL. A reação foi processada em termociclador com ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s; 93 °C por 45 s, anelamento a 55 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min; com ciclo de extensão final de 72 °C por 5 min.

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>	<b>Referência</b>
fD1 <sup>1,2</sup>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
rD1 <sup>1</sup>	AAGGAGGTGATCCAGCC	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
362f <sup>2</sup>	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	CRUZ (2001)
786f <sup>2</sup>	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	CRUZ (2001)
Y1 <sup>1</sup>	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	CRUZ (2001)
Y3 <sup>1</sup>	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	CRUZ (2001)

QUADRO 01 – PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR<sup>1</sup> E NO SEQUENCIAMENTO<sup>2</sup> DO GENE 16S *rRNA*

Para aplicação em sequenciador automático de DNA modelo *MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems*, os produtos da amplificação por PCR foram quantificados em aparelho NanoDrop<sup>®</sup> 2000 e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% com marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder corado com GelRed<sup>®</sup> 100x e visualizado sob luz ultravioleta para fotodocumentação. Para purificação dos produtos de PCR, foram adicionados 4 µL de acetato de amônia (7,5 M) e 60 µL de etanol absoluto a temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas, deixadas durante uma hora em gelo e centrifugadas em 15 °C a 5.000 g durante 45 min. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os microtubos invertidos sobre papel absorvente. Após secar, ao *pellet* formado foram adicionados 150 µL de etanol 70% recém preparado a temperatura ambiente. Homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas em 15 °C a 10.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, os microtubos invertidos sobre papel absorvente e deixados em estufa 37 °C durante 30 min. Após a secagem completa do microtubo,

foram adicionados 12  $\mu\text{L}$  de água ultra pura esterilizada. Após 24 h, a pureza do DNA foi verificada em gel de agarose 1,0% com marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder corado com GelRed<sup>®</sup> 100x e visualizado sob luz ultravioleta para fotodocumentação. A concentração das amostras foi verificada em aparelho NanoDrop<sup>®</sup> 2000 e ajustada para 16 ng de DNA por  $\mu\text{L}$ .

Para aplicação em sequenciador automático de DNA modelo *ABI PRISM 3500 Genetic Analyser*, a integridade dos produtos da amplificação por PCR foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,0% com marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder corado com GelRed<sup>®</sup> 100x e visualizado sob luz ultravioleta para fotodocumentação. Os produtos da PCR foram submetidos à purificação enzimática por Kit da *Thermo Scientific*, sendo adicionados 0,66  $\mu\text{L}$  da enzima Exonuclease I; 0,66  $\mu\text{L}$  da enzima *Thermo Scientific FastAP – Thermosensitive Alkaline Phosphatase* e 0,68  $\mu\text{L}$  de água ultra pura para 25  $\mu\text{L}$  de amostra. As amostras foram submetidas a temperaturas de 37 °C durante uma hora e 85 °C durante 15 minutos em termociclador.

### **Sequenciamento do gene 16S rRNA**

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger, Nicklen e Coulson (1977) utilizando fluoróforos em sequenciador automático de DNA. As reações foram conduzidas em microplacas de PCR com capacidade para 96 amostras, utilizando os *primers*: fD1, rD1, 362f e 786f (Quadro 01). O programa para reação de sequenciamento foi: desnaturação a 95 °C por 1 min; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 s, 55 °C por 30 s e extensão a 60 °C por 1 min e mantidos a 4 °C até serem retirados do termociclador.

Para aplicação em sequenciador automático de DNA modelo *MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems*, os produtos da primeira PCR já purificados receberam 3  $\mu\text{L}$  do kit de sequenciamento *DYEnamic ET terminator*, 2  $\mu\text{L}$  do *primer* a 1,5 pmol e 5  $\mu\text{L}$  de produto da PCR a 16 ng (total de 80 ng). O procedimento foi realizado separadamente para cada *primer* utilizado. A injeção para eletroforese capilar foi realizada em sequenciador automático com os seguintes parâmetros: voltagem de

injeção de 2 kV; tempo de injeção de 100 s, voltagem de corrida de 6 kV e tempo de corrida de 200 min.

Para aplicação em sequenciador automático de DNA modelo *ABI PRISM 3500 Genetic Analyser*, os produtos da primeira PCR já purificados receberam 1 µL de mix para sequenciamento *Big Dye*; 2 µL de tampão de sequenciamento; 0,5 µL do *primer* a 1,5 pmol; 3 µL da PCR purificada e 3,5 µL de água ultra pura. O procedimento foi realizado separadamente para cada *primer* utilizado.

Para purificação dos produtos do sequenciamento, foi utilizado o gel de filtração Sephadex™ G-50 medium. Pequenas quantidades de Sephadex™ foram distribuídas sobre a placa molde *MultiScreen Column Loader* e espalhadas com auxílio de espátula de acrílico, até completar o volume dos poços. Sob a placa molde, foi colocada uma placa de 96 poços vazia para que o Sephadex™ fosse transferido para os poços correspondentes. Foram acrescentados 300 µL de água ultra pura esterilizada em cada poço e a placa permaneceu em repouso durante 3 horas para a hidratação do polímero Sephadex™. Abaixo dessa placa, foi adicionada outra placa de 96 poços para retenção da água no momento da centrifugação. Após o período de hidratação, a placa contendo Sephadex™ foi centrifugada a 910 g durante 5 minutos e a água retida descartada. Foram adicionados 100 µL de água ultra pura esterilizada em cada poço e a placa centrifugada novamente a 910 g por 5 minutos. O processo de centrifugação foi repetido até que toda a água retida fosse descartada. A placa inferior foi substituída por uma nova placa, para que em cada poço da placa contendo Sephadex™, fossem adicionados 10 µL da reação de sequenciamento. Após centrifugação a 910 g por 5 minutos, as amostras contendo a reação de sequenciamento foram retidas na nova placa inferior. A placa contendo as amostras purificadas foi selada com filme adesivo plástico para vedação de microplaca, identificada, embalada em papel alumínio e armazenada a -20 °C até a injeção.

A qualidade das sequências retiradas do sequenciador foi avaliada pelo programa *phred* (ERWING; GREEN, 1998; ERWING *et al.*, 1998). As sequências obtidas foram comparadas no *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>) para busca de similaridade. As *type strains* dos gêneros obtidos por similaridade das sequências foram obtidas pelo banco de dados StrainInfo (<http://www.straininfo.net/>)

(DAWYNDDT *et al.*, 2005). As sequências das *type strains* foram obtidas em formato fasta pelo GenBank (BENSON *et al.*, 2013) disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As sequências foram alinhadas e editadas com cortes das extremidades, no programa MAFFT *version 7* (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATOH; STANDLEY, 2013) e a escolha do modelo evolutivo foi realizada no programa Mega5 (<http://www.megasoftware.net/>) (TAMURA *et al.*, 2010). A construção da árvore filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança com 2.000 *bootstraps* foi realizada no programa GARLI – *Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference* (<http://www.molecularevolution.org/>) (ZWICKL, 2006) e a visualização pelo programa FigTree v1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) (RAMBAUT, 2012).

### **Amplificação do gene *nifH***

A amplificação do gene *nifH* foi realizada por PCR com os *primers* nifH-F (5'-AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC-3') e nifH-R (5'-TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT-3') (TOROK; KONDOROSI, 1981) utilizando-se 3 µL de dNTPs (0,2 Mm cada); 2,5 µL de tampão 1x (Tris-base 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM); 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 Mm); 0,75 µL de cada *primer* a 10 pmol cada; 0,125 µL de Taq DNA polimerase (1,25 U); 1 µL de DNA molde a 20 ng e água ultra pura em q.s.p. volume final de reação de 25 µL. As condições de amplificação utilizadas em termociclador foram descritas por Rösch, Mergel e Bothe (2002): 4 min a 97 °C antes de adicionar a *Taq DNA polymerase* e após adicioná-la, um ciclo de desnaturação a 96 °C durante 20 segundos, anelamento a 65 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 30 segundos; dois ciclos a 96 °C por 20 s, 62 °C por 30 s e 72 °C por 35 s; três ciclos a 96 °C por 20 s, 59 °C por 30 s e 72 °C por 40 s; quatro ciclos a 96 °C por 20 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 45 s; cinco ciclos a 96 °C por 20 s, 53 °C por 30 s e 72 °C por 50 s; 25 ciclos a 94 °C por 20 s, 50 °C por 45 s e 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C durante 10 minutos. O resultado foi observado pela presença ou ausência de banda com aproximadamente 700 pb em gel de agarose 1,0% utilizando marcador de peso

molecular Low DNA Mass Ladder corado com GelRed<sup>®</sup> 100x, sob luz ultravioleta para fotodocumentação.

## CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROMOTORA DE CRESCIMENTO

### **Mecanismo direto por aumento da disponibilidade de nutrientes**

#### *Produção de Sideróforo*

Este método utiliza-se de um complexo corante-ferro altamente colorido, foi descrito por Schwyn e Neilands (1987). Os sideróforos produzidos por bactérias são ligantes fortes que sequestram e complexam o ferro, detectados pela mudança de cor na análise de cromoazurol S (CAS). Primeiramente, foi preparada uma solução CAS (60,5 mg de CAS em 50 mL de água destilada, misturados a 10 mL de ferro (III)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM em HCl 10 mM) estéril, misturada sob vagarosa agitação a uma solução estéril contendo 72,9 mg de HDTMA (hexadecyltrimethylamonium) dissolvidos em 40 mL de água destilada.

Em meio DYGS (Dextrose 2 g; Peptona 1,5 g; Extrato de levedura 2 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4$  0,5 g; Ácido L-glutâmico 1,5 g; Ágar 15 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 7,0) deficiente de ferro foi adicionada a solução CAS, onde foram inoculados aleatoriamente três isolados bacterianos por quadrante da placa de Petri e incubados a 28°C. O crescimento de colônias foi observado durante cinco dias e a mudança de cor do meio de azul para amarelo indicou resultado positivo para produção de sideróforos (CATELLAN, 1999).

#### *Solubilização de Fosfato*

Para o teste de solubilização de fosfato, utilizou-se o protocolo de Chagas Junior *et al.* (2010) com adaptações. Foi utilizado o meio de cultura GL (Glicose 10 g; extrato

de levedura 2 g, Agar 15 g com adição de uma solução 0,25 g/L de  $K_2HPO_4$  e outra 1 g/L de  $CaCl_2$ ;  $H_2O$  destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 6,5) onde foram inoculados aleatoriamente três isolados bacterianos por quadrante da placa de Petri em triplicata. As placas incubadas a 28°C com crescimento de colônias observado durante quatorze dias. A formação de halo translúcido ao redor da colônia indicou resultado positivo para o teste de solubilização de fosfato.

### *Fixação Biológica de Nitrogênio*

Para detecção do potencial de fixação assimbiótica de nitrogênio, o teste foi adaptado de Araújo *et al.* (2004). Os isolados foram inoculados em frascos de penicilina contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido sem fonte de nitrogênio JNFB (Ácido málico 5 g;  $K_2HPO_4$  0,6 g;  $KH_2PO_4$  1,8 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g; NaCl 0,1 g;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0,02 g; Extrato de levedura 20 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,08 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  2,4 mg;  $H_3BO_3$  2,8 mg;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  2 mg;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  2,35 mg;  $Na_2EDTA$  65,6 mg; Biotina 0,1 mg; Piridoxina 0,2 mg; KOH 4,5 g; Azul de bromotimol 0,5% 2 mL; Ágar 2,2 g; pH 6,8). Os frascos foram incubados em temperatura de 28 °C sob agitação de 120 rpm e após sete dias de incubação, foram repicados seis isolados por placa de Petri com auxílio de alça de platina em meio sólido JNFB suplementado com 20 mg/L de extrato de levedura. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C durante sete dias. Os isolados crescidos em meio sólido foram reinoculados em meio JNFB semi-sólido sem nitrogênio e os isolados que apresentaram formação de película foram considerados prováveis fixadores de nitrogênio biológico. A reinoculação sucessiva dos isolados foi realizada para evitar que o crescimento dos isolados e a formação de película fossem devido às reservas de nitrogênio das células bacterianas acumuladas no meio de estoque.

### **Mecanismo direto por produção de fitormônio**

#### *Produção de Ácido Indol Acético*

A verificação da produção de ácido indol acético (AIA) foi realizada de acordo com Kuss *et al.* (2007) com adaptações: os isolados foram inoculados em microtubos contendo 1 mL de meio de cultura líquido DYGS com incubação sob agitação de 120 rpm a 30 °C durante 72 h. Cada amostra foi inoculada em três microtubos, sendo uma apenas com meio DYGS e dois com meio DYGS acrescido de 10 µL de triptofano 10 mg/mL filtrado em membrana milipore 0,2 µm e armazenado a 4 °C. Após o período de incubação, os microtubos foram centrifugados a 10.000 g em 4 °C durante 15 minutos e 900 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo ao qual foi adicionado 600 µL de Reagente de Salkowski (SARWAR; KREMER, 1995). O reagente de Salkowski foi aplicado no escuro e deixado durante 30 minutos para reagir com o sobrenadante. Após esse período, a intensidade de coloração foi avaliada por espectrofotometria em comprimento de onda de 600 nm. Os valores de absorvância obtidos foram multiplicados pelo peso molecular da auxina comercial ( $C_{10}H_9NO_2 = 175,19$ ) e os valores finais expressos em  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Os dados foram transformados por *raiz de x + ½* e as análises estatísticas foram executadas no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002) com teste de Tukey a 5% de significância.

## **Mecanismo indireto por produção de enzimas**

### *Produção de amilase*

Para detecção de amilase, foram repicados aleatoriamente três isolados bacterianos por quadrante da placa de Petri em meio de cultura sólido MM9 [Solução de sais 200 mL ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  64 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 g; NaCl 2,5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL);  $\text{MgSO}_4$  1M 2 mL; Glicose 10 g;  $\text{CaCl}_2$  1M 0,1 mL; Agar 15 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL; pH 7,0] contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel. Após o crescimento das colônias, foram adicionados a cada placa 10 mL de solução de iodo (3 g de KI em 10 mL de água destilada, com adição de 1 g de cristais de iodo e  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 100 mL) seguido de lavagem imediata com água destilada. A presença de halo incolor ao redor da colônia indicou resultado positivo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

### *Produção de celulase*

Esse método foi adaptado de Renwick, Campbell e Coe (1991) para detectar a hidrólise de celulase por reação colorimétrica com solução do corante Vermelho de Congo em meio Mineral ( $\text{CaCO}_3$  0,02 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g; KCl 1,71 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  4,11 g; Ágar 15 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1.000 mL; 0,5% de carboximetilcelulose; pH 5,0). As placas de Petri contendo o meio de cultura sólido foram divididas em quatro quadrantes, sendo que em cada quadrante foram repicadas aleatoriamente três colônias de bactérias. O teste foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 28°C com crescimento bacteriano observado durante sete dias. Após esse período de incubação, em temperatura ambiente, a cada placa foi adicionada a solução de Vermelho Congo 1% até a cobertura total do meio durante 15 minutos. Após esse período as placas foram lavadas com água destilada e o resultado positivo foi detectado pelo aparecimento de halos claros ao redor das colônias.

### *Produção de pectinase*

A detecção de produção de pectinase foi realizada em meio de cultura MM9 (o mesmo utilizado no teste de amilase) contendo 1% de pectina. Em cada um dos quatro quadrantes da placa de Petri foram repicadas aleatoriamente três colônias de bactérias. O teste foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 28°C com crescimento bacteriano observado durante sete dias. Após esse período de incubação, em temperatura ambiente, a cada placa foram adicionados 10 mL de lugol seguido de lavagem com água destilada. A presença de halo incolor ao redor da colônia indicou resultado positivo (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

### *Produção de quitinase*

Para detecção de quitinase, a fonte de carbono do meio MM9 (o mesmo utilizado no teste de amilase) utilizada foi 0,08% de quitina coloidal produzida a partir

da carapaça de siri (MOURA *et al.*, 2005) com as seguintes adaptações: utilizados 50 g de carapaças de siri limpas e moídas até atingirem aspecto pulverizado; desmineralização das carapaças com adição da solução de HCl 7% durante 14 h na proporção de 4:1 de solução ácida/carapaça, sucessivas lavagens com água destilada e secagem em estufa a 120 °C até peso constante; desproteinização pela adição da solução de NaOH 5% durante 2 h em agitador a 60 rpm, sucessivas lavagens com água destilada e secagem em estufa a 120 °C até peso constante; desodorização com adição do reagente NaClO 0,36% durante 3 h sob agitação a 60 rpm, sucessivas lavagens com água destilada e secagem em estufa a 120 °C até peso constante. As colônias foram repicadas da mesma forma que no teste de produção de celulase e o crescimento bacteriano observado até 10 dias de incubação. Os resultados positivos foram detectados pela formação de halo claro ao redor da colônia (REHWICK; CAMPBELL; COE, 1991).

#### *Produção de urease*

O meio de cultura urease ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g; NaCl 10%, 10 mL; Extrato de levedura, 1 g; Azul de bromotimol 0,5%, 2,5 mL; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 800 mL; pH 5,8) foi distribuído em tubos de ensaio mantidos na posição vertical para esterilização por autoclavagem. Para o preparo da solução, foram misturados 20 g de ureia em 180 mL de água destilada. A solução foi esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm. Em condições assépticas, foi adicionado 1 mL da solução para cada tubo com 4 mL de meio. No meio de cultura sólido, originalmente verde contido em tubos de ensaio inclinados, foi semeada uma alçada de bactéria e os tubos incubados durante cinco dias. A mudança da cor do meio para azul indica resultado positivo devido à alcalinização do meio proporcionado pela produção de urease por meio da degradação da amônia (DYE, 1968).

#### *Detecção de atividade esterásica*

Para detecção de atividade esterásica ou lipásica, foram repicados aleatoriamente três isolados bacterianos por quadrante da placa de Petri em meio de cultura sólido lipase/esterase (Peptona 10 g; NaCl 5 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1 g; Ágar 15 g; H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 990 mL; pH 7,4) acrescido de 1% de Tween 80 previamente esterilizado. O teste foi realizado em triplicata com incubação a 28 °C e crescimento bacteriano observado durante 10 dias. A presença de halos ao redor das colônias, formados por cristais, revelou resultado positivo para a produção de esterases (SIERRA, 1957).

#### *Detecção de atividade proteolítica*

Para o teste de atividade proteolítica por degradação de caseína, os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo meio Leite-desnatado-ágar (leite desnatado q.s.p. 1.000 mL aquecido a 55 °C; Trypticase-Soja-Agar 6 g; Ágar 20 g; pH 7,0) e a atividade de protease foi determinada por formação de halos ao redor das colônias após cinco dias de incubação a 28°C (BERG *et al.*, 2002).

#### **Mecanismo indireto por antagonismo a fungos**

O teste de cultura pareada foi realizado segundo Shiomi, Melo e Minhoni (2008). Em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar foram colocados um disco do micélio crescido do fungo a ser inibido e lateralmente, uma riscagem da bactéria possivelmente inibidora. As placas foram mantidas em B.O.D. a 28 °C durante sete dias. A inibição do crescimento do fungo foi avaliada por medições do raio do fungo e comparação com controle sem bactéria. O teste foi realizado em triplicata para cada fungo testado. As análises estatísticas foram executadas no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002) com teste de Tukey a 5% de significância.

#### **Teste de Germinação**

As sementes foram submetidas a teste de germinação de acordo com as Regras de Análise de Sementes (RAS, 2009) com duas repetições de cada híbrido e cada repetição com 60 sementes. As sementes foram passadas em álcool 70%, colocadas em hipoclorito de sódio 3% e posteriormente em água destilada autoclavada para desinfestação superficial. Sessenta sementes foram colocadas em papel de germinação umedecido com água na proporção de duas vezes e meia o seu peso. O papel filtro foi enrolado, acondicionado em saco plástico de polipropileno e deixado em câmara de germinação a 28 °C sob luz, e 25 °C no escuro, com fotoperíodo de 16 h e 8 h. Após três dias foi realizada a primeira contagem de sementes germinadas e aos sete dias, a segunda e última contagem. Para ser considerada germinada, a raiz e o hipocótilo deveriam ultrapassar o tamanho da semente. Foi realizada avaliação de crescimento por meio de medição do comprimento e volume da raiz e do hipocótilo emergidos nas sementes. As medidas foram avaliadas utilizando-se o *software* Winrhizo v.4.0, (Regent Systems, Quebec, Canadá). As análises estatísticas foram executadas no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002) com teste de Tukey 5% de significância.

### **Experimento em Casa de Vegetação**

O experimento para avaliação do desempenho dos isolados bacterianos inoculados em sementes de milho foi conduzido em casa de vegetação da EMBRAPA Soja de Londrina, Paraná. As bactérias foram repicadas em 5 mL de meio Luria Bertani a 28 °C, submetidas a agitação de 120 rpm durante 24 h. A concentração de células bacterianas na solução foi estimada por espectrofotometria em comprimento de onda de 600 nm e ajustada com solução fisiológica esterilizada de NaCl 0,85% para  $10^8$  células/mL.

As sementes de milho inoculadas correspondem aos híbridos comerciais ATL100 e KWX628 e foram cedidas pela empresa Semilia Genética e Melhoramento Ltda. O teste de germinação foi realizado com duas repetições de cada híbrido e cada repetição com 60 sementes (SHIOMI; MELO; MINHONI, 2008). As sementes foram desinfestadas com álcool 70%, hipoclorito de sódio 3% e água destilada antes de

serem inoculadas em vasos de Leonard. Os vasos continham areia e carvão moído na proporção 1:1 com solução nutritiva estéril para plantas (para 1 litro de solução final foi adicionado 1mL de solução estoque:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  147,05 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  68,05 g; EDTA de ferro 7,34 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  61,65 g;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  43,5 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,169 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,124 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,144 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,05 g;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,028 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,0553 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1000 mL e pH 6,6-6,8) (BROUGHTON; DILWORTH, 1971).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 15 tratamentos: 12 bactérias testadas, um controle positivo com a cepa padrão Ab-V05 de *Azospirillum brasilense*, um controle negativo sem nitrogênio e um controle negativo com nitrogênio. Foram realizadas quatro repetições para cada híbrido de milho no total de 120 vasos (15 x 4 x 2). Em cada vaso foram semeadas três sementes com desbaste de uma planta após sete dias, restando assim, duas réplicas por repetição.

Em cada semente foi inoculado 0,5 mL de solução contendo bactérias na concentração ajustada para  $10^8$  células/mL. A solução inicial recebeu adição da metade de nitrogênio recomendado para cultura de milho (2,5 mL de solução por vaso:  $\text{KNO}_3$  57,8 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 250 mL) e a cada dez dias a partir da inoculação, a solução dos vasos foi repostada juntamente com solução de fósforo (50 mL por vaso de:  $\text{H}_4\text{CaO}_8\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  4,07 g;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1000 mL). Os vasos foram mantidos em temperatura média de 28 °C durante 35 dias. Após esse período, foi realizada a avaliação biométrica do material vegetal: contagem do número de folhas por planta; medição da altura da planta até o último nó de inserção das folhas (cm), ambas com o auxílio de régua e diâmetro do colmo a partir do primeiro nó (mm) com auxílio de paquímetro digital.

A parte aérea foi separada da raiz com corte rente ao substrato, para avaliação das folhas no aparelho Area Meter LI-COR<sup>®</sup> Biosciences modelo LI-3100C com medição da área foliar (cm<sup>2</sup>). Foram avaliados o comprimento (cm) e o volume (cm<sup>3</sup>) da raiz por meio do software Win-rhizo<sup>®</sup> v.4.0. As amostras das partes aérea e radicular foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas à temperatura de 60 °C em estufa de secagem durante 48 h. Após esse período foram mensuradas em balança analítica as massas (g) das partes aérea e radicular secas. As avaliações da

quantidade de nitrogênio e fósforo contida nas folhas foram realizadas pela EMBRAPA Soja. Os dados foram transformados por *raiz de  $x + \frac{1}{2}$*  e as análises estatísticas foram executadas no programa Assistat 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2002) com análise de variância e teste de Tukey a 5% significância.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVFN – Advanced Financial Inc. **Revista ADVFN**, 2012. Disponível em: <http://wiki.advfn.com/pt/Milho:Caracter%C3%ADsticas>.

ANTOUN, H.; PRÉVOST, D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. **PGPR: biocontrol and biofertilization**, p.1-38, 2006.

ARAÚJO, L.M.; MONTEIRO, R.A.; SOUZA, E.M.; STEFFENS, M.B.R.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; CHUBATSU, L.S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**. v.155, n.6, p. 491-495, 2004.

ARAÚJO, W.L. de; LACAVAL, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O. de S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. de. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2010, 169p.

ARAUJO, F.F.; FOLONI, J.S.S.; WUTZKE, M.; MELEGARI, A.da S.; RACK, E. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.3, p.1043-1054, 2013.

ARRUDA, L.M. **Seleção e Caracterização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Milho Cultivadas no Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, n.5/6, v.29, p.911-922, 1997.

BEATTIE, G. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. **Biomedical and Life Sciences**, n.1, p.1-56, 2006.

BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J., OSTELL, J.; SAYERS, E.W. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v.41, D36-42, 2013.

BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L.; ZOCK, A.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3328-3338, 2002.

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.

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v.42, p.241-250, 1995.

BROUGHTON, W.J.; DILWORTH, M.J. Controlo f Leghaemoglobin Synthesis in Snake Beans. **Biochemical Journal**, p.1075-1080, 1971.

BUYER, J.S.; KRATZKE, M.G.; SIKORA, L.J. A method for detection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth-promoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.677-681, 1993.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII da Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. EMBRAPA Soja, Londrina, 2007, 212p.

CATELLAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. EMBRAPA Soja, Londrina, 1999, 36p.

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.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

CONCEICAO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; CONCEIÇÃO, P.S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v.39, n.6, 2009.

CRUZ, L. M. **Caracterização e Análise Filogenética Molecular de Novos Isolados Fixadores de Nitrogênio**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

DALL'AGNOL, R.F.; RIBEIRO, R.A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; DELAMUTA, J.R.M.; ANDRADE, D.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, n.Pt11, p.4167-4173, 2013.

DAWYNDDT, P.; VANCANNEYT, M.; De MEYER, H.; SWINGS, J. Knowledge accumulation and resolution of data inconsistencies during the integration of microbial information sources. **IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering**, v.17, n.8, p.1111-1126, 2005.

DERAL – Departamento de Economia Rural. 2014. Disponível em: [https://www.afnews.com.br/Insumos/Producao\\_do\\_milho\\_safrinha\\_2013-14](https://www.afnews.com.br/Insumos/Producao_do_milho_safrinha_2013-14).

DYE, D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia* 1 The “amylovora” group. **New Zeal Journal Science**, v.11, p.590-607, 1968.

DEY, R.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v.159, p.371-394, 2004.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. **Embrapa-CNPAB**, Brasília, 1995.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites, 1976.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v.1, p.261-272, 1958.

DUAN, J.; JIANG, W.; CHENG, Z.; HEIKKILA, J.J.; GLICK, B.R. **The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas* sp. UW4**. PLoS ONE, v.8, n.3, e58640, 2013.

ELMERICH, C.; NEWTON, W.E. **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. Dordrecht: Springer, 2007. 321 p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **EMBRAPA MILHO E SORGO**, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br>.

ERWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

ERWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment, **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

EVARISTO, J.A.M. Sequenciamento de Nova Geração. **VI Curso de Inverno de Genética**. Departamento de Genética, UFPR, 2013.

GABY, J.C.; BUCKELY, D.H. A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase. **PLoS ONE**, n.7, n.7, 2012.

GALVÃO, P.G.; URQUIAGA, S.; VIDAL, M.S.; BALDANI, J.I. Interação entre plantas e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **EMBRAPA Agroecologia**, Documentos 270, 2010. 63 p.

GURTLER, V.; STANISH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology (Reading)**, 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.

HALLMANN, J. Plant interactions with endophytic bacteria. **Biotic interactions in plant pathogen associations**, p.87-119, 2001.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597-607, 1975.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **American Microbiology**, v.60, p.579-598, 2010.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. **EMBRAPA Soja**. Documento 325, 2011. 36p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v.331, p.413-425, 2010.

IKEDA, A.; BASSANI, L.L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V.K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M.B.R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L.V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v.65, p.154-160, 2013.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.772-780, 2013.

KENNEDY, A.C. Rhizosphere. **Principles and Applications of Soil Microbiology**, New Jersey, p.357-384, 2005.

KEROVUO, J.; LAURAEUS, M.; NURMINEN, P.; KALKKINEN, N.; APAJALAHTI, J. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase

from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2079-2085, 1998.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. **Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria**, v.2, p.879-882, 1978.

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.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.251-257, 2003.

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.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.4, n.2, p.12, 2010.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.63, p.541-556, 2009.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

MOURA, J.M.; FERREIRA, A.F.C.; SILVA, F.M.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A. Obtenção de quitina a partir de carapaças de siri (*Maia squinado*): uso de um planejamento experimental na etapa de demineralização. **Vetor**, 2005, 717p.

NHEL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, p. 1-20, 1997.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1-12, 1994.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; CHUEIRE, L.M.O.; TIEDIE, J.M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Genome Sequences of *Burkholderia* sp. Strains CCGE1002 and H160, Isolated from Legume Nodules in Mexico and Brazil. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.24, p.6927, 2012.

PERIN, L.; REIS, V.M. Água como veículo de preservação de isolados de bactérias diazotróficas. Comunicado técnico. **EMBRAPA Agrobiologia**, Seropédica, 1999.

RAJU, P.N.; EVANS, H.J.; SEIDLER, R.J. An Asymbiotic Nitrogen-Fixing Bacterium from the Root Environment of Corn. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.69, n.11, p.3474-3478, 1972.

RAMBAUT, A. **Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2006-2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.

RAS – Regras para Análise de Sementes. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária: Brasília, MAPA/ACS, 399 p. 2009.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v.6, n.4, p.139-144, 1998.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assesment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v.40, p.524-532, 1991.

RIBEIRO, R.A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R.F.; GRAHAM, P.H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Andean and Mesoamerican areas. **Research Microbiology**. v.164, n.7, p 740-748, 2013.

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ, E.S. de; PASSAGLIA, L. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.924-927, 2005.

RÖSCH, C.; MERGEL, A.; BOTHE, H. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, n.8, p.3818-3829, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COUSOL, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, O.J.A.P. dos; MILANI, K.M.L.; MOREIRA, G.G.; ZUCARELLI, J.V.; LIMA, G. de; TAKAHASHI, B.Y.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA, A.L.M. de. Avaliação da arquitetura de plantas de milho inoculadas com diferentes estirpes de bactérias promotoras do crescimento vegetal. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.3, p.384-387, 2013.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant Soil**, v.172, p.261-269, 1995.

SCHMIDT, SOUZA, E.M.; BAURA, V.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, p. 182-185, 2011.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v.9, p.535-538, 2008.

SIERRA, G. A. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. **Antonine van Leeuwenhoeck**, v.28, p.15-22, 1957.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.4, n.1, p71-78, 2002.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de GENÉTICA**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 903 p.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p.425-448, 2007.

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.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0, 2010.

TERASAWA JUNIOR, F. **Implicações da interação genótipo-ambiente no melhoramento do milho no Estado do Paraná**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

TOROK, I.; KONDOROSI, A. Nucleotide sequence of the *R. meliloti* nitrogenase reductase (*nifH*) gene. **Nucleic Acids Research**, v.9, p.5711–5723, 1981.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizosphere as biofertilisers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

VOHARA, A.; SATYANARAYANA, T. Pitases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.23, n.1, p.29-60, 2003.

WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Bactérias Diazotróficas em mudas de Bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.11, p.2277-2285, 2000.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

WINDING, A.; BINNERUP, S.J.; PRITCHARD, H. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, n.47, p.129–141, 2004.

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.

ZWICKL, D.J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion.** (Ph.D. dissertation) The University of Texas at Austin, 2006.