

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE AUXINAS ASSOCIADAS ÀS
RAÍZES DE ORQUÍDEAS.**

**Renato Fernandes Galdiano Júnior
Biólogo**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Junho de 2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE AUXINAS ASSOCIADAS ÀS
RAÍZES DE ORQUÍDEAS**

Renato Fernandes Galdiano Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Renato Fernandes Galdiano Júnior – Filho de Valdete dos Anjos Galdiano e Renato Fernandes Galdiano, nasceu aos 22 de março de 1984, no município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Licenciado e Bacharel em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, no ano de 2006. Ingressou no programa de pós graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na mesma instituição, a partir de março de 2007.

"De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos apenas começando,

A certeza de que é preciso continuar

E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,

Fazer da queda um passo de dança,

Fazer do medo uma escada,

Fazer do sonho a ponte."

(Fernando Sabino)

DEDICO:

Aos meus queridos pais Valdete Aparecida do Anjos Galdiano e Renato Fernandes Galdiano, pelo intenso carinho com que me ensinaram a viver, pelo apoio, incentivo, pela minha formação, por dedicarem suas vidas aos seus filhos e por serem exemplos de vida e acreditarem em mim.

As queridas Rosana e Raquel pela amizade, paciência, apoio em todos os momentos e felicidade de tê-las como irmãs

OFEREÇO

Ao Sr. Amaury Galdiano (in memorian), dona Edith Fernades Galdiano, Ivone e Cláudia, pelo apoio, paciência, exemplos de fibra, discernimento e dedicação.

Amo muito vocês !!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- A profa Dra. Eliana G. de Macedo Lemos pela orientação; por acreditar em mim, pelo exemplo de dedicação e competência profissional;

- A toda a equipe do LBMP (Ana Rita, Karla, Eliamar, Érica, Wellington, Érico, Máira, Maria Tereza Tetê, Maria Tereza Fenerich, Rosângela Rosinha, Aroldo, Silvana, Simone, Tereza, Tehune, Luciano, Jackson, Andressa, Douglas, Fernanda, Maurício Russo, Maurício Cantão, Joice) e do Depto. de Tecnologia, que direto ou indiretamente estiveram envolvidos com este trabalho; pelo companheirismos, paciência e grandes alegrias;

- A profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves e Dr. João Carlos Campanharo pelas constantes sugestões e, principalmente, por constituírem duas grandes pilstras do LBMP;

- A Fapesp pela bolsa de Mestrado e auxílio à pesquisa, imprescindíveis para a realização desta pesquisa;

- As Profa. Dra. Kathia Fernandes Lopes Pivetta e Profa. Dra. Janete Desidério Sena pelas valiosas sugestões durante o exame geral de qualificação;

- Aos professores Dr. Ricardo Tadeu de Faria e profa. Dra. Kathia F. L. Pivetta,

pelas sugestões importantes para o aprimoramento desta dissertação durante o exame de defesa;

- Ao grupo das RPCP simbiontes ou de vida livre do LBMP. Pelo companheirismo, amizade e dedicação, por proporcionarem um ambiente saudável e de cooperação no Laboratório;

- Aos companheiros da República Kilombo (Assado, Picolino, Argos, Pudendo, Tchegay e Zumbi) pelos bons momentos compartilhados;

- Aos professores e alunos colegas das disciplinas de pós-graduação. Que o tempo e a distância não nos separe;

- A "galera do barulho" (Aline, Alice, Franco, Fernando Henrique, Larissa, Lesliene, Willian e Thales) pelos momentos raros, porém sempre inesquecíveis os quais sempre justificam esperar pelos longos períodos enquanto não estamos juntos. Sinto por todos sinceros sentimentos de grande amizade e companheirismo;

- A Deus, por ter proporcionado esta oportunidade.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
I.INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
II.1 A família Orchidaceae: características e potencial econômico.....	3
II.1.1 Espécies terrestres utilizadas neste estudo.....	5
II.1.2 Espécies epífitas utilizadas neste estudo.....	7
II.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas.....	8
II.3 Hormônios vegetais e produção bacteriana de compostos reguladores do crescimento vegetal.....	9
II.4 Produção bacteriana de auxinas.....	11
II.5 Benefícios atribuídos a bacterização de plantas.....	14
II.6 Identificação e caracterização molecular de microrganismos.....	15
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
III.1 Coleta de raízes e isolamento bacteriano.....	16
III.1.1 Amostras de raízes	16
III.1.2 Isolamento, purificação e estocagem de linhagens bacterianas.....	17
III.2 Quantificação de Ácido Indol Acético (AIA) bacteriano.....	19
III.2.1 Ensaio colorimétrico para determinação de AIA.....	19
III.2.2 Extração e identificação de AIA e compostos indólicos.....	19
III.3 Ensaio para avaliação da atividade biológica de AIA bacteriano em sementes e raízes de orquídea.....	21
III.3.1 Inoculação em plântulas germinadas <i>in vitro</i> em fase de aclimatização <i>ex vitro</i>	21
III.3.2 Inoculação de sementes e cultivo <i>in vitro</i>	23

III.4 Identificação dos isolados bacteriano	23
III.4.1 Extração e quantificação de DNA genômico.....	23
III.4.2 Amplificação do gene 16S rRNA e documentação do produto amplificado.....	25
III.4.3 Purificação e sequenciamento dos fragmentos 16S rRNA.....	26
III.4.4 Análise das sequências e homologia com banco de dados.....	27
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
IV.1 Coleta de raízes e isolamento bacteriano.....	28
IV.2 Detecção e quantificação de Ácido Indol-Acético bacteriano.....	30
IV.2.1 Quantificação por colorimetria.....	30
IV.2.2 Detecção de AIA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	36
IV.3 Ensaios para avaliação da inoculação de bactérias produtoras de auxinas em orquídeas.....	38
IV.3.1 Inoculação em sementes de <i>Cattleya walkeriana</i>	41
IV.3.2 Inoculação em plântulas germinadas <i>in vitro</i> e aclimatização <i>ex vitro</i>	42
IV.4 Identificação dos isolados bacterianos.....	45
V. CONCLUSÕES.....	51
VI. REFERÊNCIAS.....	52

INDICE DE TABELAS

TABELA 1: Quantidade de bactérias isoladas de cinco orquidáceas brasileiras e uma estrangeira em meio Czapek ágar e Amido Amônio Nutriente ágar.....	28
TABELA 2: Produção de AIA por isolados bacterianos em meio Czapek Líquido suplementado com DL-triptofano (200 µg mL ⁻¹) após 48 horas de incubação.....	32
TABELA 3: Influência da inoculação de isolados rizobacterianos para a germinação <i>in vitro</i> de sementes de <i>Cattleya walkeriana</i> (modificado de STEWART et al., 2003).....	41
TABELA 4. Promoção de crescimento de plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> inoculadas com isolados rizobacterianos após aclimatização em casa de vegetação durante 90 dias.....	43
TABELA 5: Identificação de isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....	48

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Espécies terrestres e epífitas investigadas neste estudo.....	6
FIGURA 2: Rotas biossintética do Ácido 3-Indol-Acético (AIA) a partir do aminoácido triptofano em bactérias e plantas.....	13
FIGURA 3: Equação da reta dos padrões de concentrações de AIA comercial.....	30
FIGURA 4: Padrões de concentrações de AIA comercial.....	31
FIGURA 5: Quantificação de AIA utilizando o reagente de Salkowski.....	31
FIGURA 6: Detecção de compostos indólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no sobrenadante da cultura líquida das rizobactérias.....	37
FIGURA 7: Dinâmica de crescimento e produção bacteriana de AIA na cultura líquida dos isolados utilizados nos bioensaios.....	39
FIGURA 8: Plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> obtidas em cultivo assimbiótico ao final do estágio <i>in vitro</i>	40
FIGURA 9: Inoculação de sementes de <i>Cattleya walkeriana</i>	40

FIGURA 10: Perfil eletroforético do DNA genômico extraído de 23 isolados bacteriano.....46

FIGURA 11: Perfil eletroforético da amplificação do gene 16S rRNA.....47

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA – Ácido Indol-Acético

AIAld – Ácido Indol-Acetaldeído

AIL – Ácido Indol-Lático

AIP – Ácido Indol-Pirúvico

CLAE / HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

CTAB – Brometo de cetil-trimetilamônio

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Trifosfato de deoxirribonucleotídeo

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

MAAN – Meio Amido-Amônio Nutriente Ágar

MC – Meio Czapek Ágar

PCR – Reação em cadeia da DNA Polimerase

$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$

RPCP – Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

RNase – Ribonuclease A

rRNA – Ácido Ribonucléico ribossomal

SDS – Duodecil sulfato de sódio

TE – Solução tampão Tris-EDTA

TEB – Solução tampão Tris-EDTA-Borato

Tris – Hidroximetil aminometano

UV – Luz ultra-violeta

UFC – Unidades formadoras de colônias

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE AUXINAS ASSOCIADAS ÀS RAÍZES DE ORQUÍDEAS

RESUMO – A rizosfera favorece a colonização radicular por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), as quais podem oferecer importantes benefícios para a hospedeira. Este estudo teve o objetivo de isolar e identificar bactérias produtoras de auxinas das espécies *Cattleya walkeriana*, *Cyrtopodium paludicolum*, *Lonopsis utricularioides*, *Oeceoclades maculata*, *Phalaenopsis amabilis* e *Vanilla planifolia* e avaliar a inoculação de sementes e plântulas da orquídea brasileira *Cattleya walkeriana*. Ao total, foram isolados 85 bactérias, 67 delas produtoras de auxinas (quantificados por ensaios colorimétrico e detectados por CLAE) e 26 foram identificadas pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Seis isolados produtores de auxinas foram inoculados em bioensaios. Para a inoculação *in vitro*, sementes foram inoculadas com os isolados *Burkholderia* RzW32, *Enterobacter* Endw37, *Curtobacterium* Endw57, *Bacillus* EndW60 e testemunha representada por água destilada autoclavada em meio nutritivo Knudson-C e mantidas em câmara de incubação com luminosidade e temperatura controladas. Após 120 dias, a germinação do tratamento controle apresentou-se bem desenvolvida, ao contrário de sementes dos tratamentos inoculados. No experimento de bacterização *ex vitro*, plântulas germinadas em cultivo assimbiótico *in vitro* foram inoculadas com os isolados *Burkholderia* RzW32, *Curtobacterium* RzW35, *Enterobacter* EndW37, *Bacillus* EndW48 e testemunha. Após 90 dias de cultivo em condições de casa de vegetação, foram avaliados porcentagem de sobrevivência, área foliar, número de raízes, comprimento das raízes, massa de matéria seca da parte radicular e da parte aérea, índice de aumento da área foliar e índice de aumento da massa seca total. *Curtobacterium* sp. e *Burkholderia* sp. proporcionaram a menor eficiência para o crescimento enquanto *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. favoreceram à promoção do crescimento em todos os parâmetros investigados e podem ser recomendados para o crescimento e sobrevivência *ex vitro* durante a aclimatização de plântulas de *Cattleya walkeriana*.

Palavras chaves: Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, ácido indol-acético, orquídeas, aclimatização.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND INOCULATION OF AUXIN YELDER BACTERIA ASSOCIATED WITH ORCHIDS ROOTS

SUMMARY – The rhizosphere promotes root colonization by Plant growth-promoting rizobacteria (PGPR), which may offer significant benefits to the host. This study aimed to isolate and identify auxin-producing bacteria of the species *Cattleya walkeriana*, *Cyrtopodium paludicolum*, *Ionopsis utricularioides*, *Oeceoclades maculata*, *Phalaenopsis amabilis* and *Vanilla planifolia*, and evaluate seeds and seedlings inoculation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana*. In total, 85 bacteria were isolated, 67 of them produce auxins (quantified by colorimetric assays and detected by HPLC) and 26 were identified by partial sequencing of 16S rRNA gene. Six-producing isolates were inoculated in auxin bioassays. For *in vitro* inoculation, seeds were inoculated with isolates *Burkholderia* RzW32, *Enterobacter* Endw37, *Curtobacterium* Endw57, *Bacillus* EndW60 and control represented by distilled autoclaved water in nutrient medium Knudson-C and kept in an incubation chamber with controlled temperature and luminosity. After 120 days, the germination of the control treatment presented was well developed, unlike seeds of inoculated treatments. In the experiment of bacterization *ex vitro*, asymbiotic *in vitro* germinated seedlings were inoculated with isolates *Burkholderia* RzW32, *Curtobacterium* RzW35, *Enterobacter* EndW37, *Bacillus* EndW48 and control. After 90 days of cultivation in a greenhouse, were evaluated for survival percentage, leaf area, number of roots, root length, dry matter of the root and shoot, rate of increase in leaf area index and increase in total dry mass. *Curtobacterium* sp. RzW35 and *Burkholderia* sp. RzW32 provided the lowest efficiency for growth while *Bacillus* sp. EndW48 and *Enterobacter* sp. EndW37 to encourage growth in all parameters investigated and may be recommended for growth and survival during *ex vitro* acclimatization of seedlings of *Cattleya walkeriana*.

Keywords: Plant growth-promoting rhizobacteria, indole-acetic acid, orchids, acclimatization.

I. INTRODUÇÃO

A capacidade de microrganismos estimular a germinação e posterior crescimento e desenvolvimento de plantas tem sido adaptada para cultivos *in vitro* e *in vivo* de uma série de plantas com importância agrícola, industrial e ornamental. São descobertas cada vez mais funções gênicas, particularmente com propósitos de incremento da produtividade vegetal, biorremediação ambiental e moléculas comerciais. Assim, a utilização destes organismos abre novas áreas de exploração biotecnológica baseadas no isolamento, caracterização e determinação da diversidade microbiana em diferentes espécies de plantas.

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) são bactérias de vida livre no solo e que podem se associar com algumas plantas, desencadeando diversos benefícios para o crescimento da hospedeira. Um fator de ampla importância é a biossíntese e fornecimento de hormônios vegetais, essenciais para a coordenação de diversos aspectos fisiológicos. Dentre estes hormônios, se destacam as auxinas e o ácido indol-acético, o qual é o principal, mais abundante e mais responsivo estimulador do crescimento em plantas.

A família Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificada do reino vegetal, com várias espécies registradas no mundo inteiro. Constitui aproximadamente 7% de todas as Angiospermas e apresentam distribuição cosmopolita, embora seja mais abundante e diversificada em florestas tropicais, especialmente da Ásia e das Américas.

O Brasil detém uma das maiores diversidades de orquídeas do Continente Americano e do mundo, com cerca de 2.500 espécies e novas espécies descobertas tem sido frequentemente relatadas. No entanto, o desbravamento e derrubada de áreas, como as do Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, têm ameaçado e levado à extinção algumas dessas espécies, incluindo aquelas que talvez ainda não foram conhecidas.

Em algumas orquídeas a germinação é auxiliada, principalmente, por meio da adição de auxinas em cultivo assimbiótico, teoria que pode ser extensiva ao cultivo simbiótico, pois WILKINSON (1994a) constatou que a germinação da espécie terrestre

australiana *Pterostylis vittata* Lind. foi intensificada por AIA e possivelmente outros compostos de rizobactérias produtoras de auxinas isoladas da orquídea hospedeira.

TSAVKELOVA et al. (2007b) mostraram, sob um ponto de vista prático, que a inoculação de sementes com isolados produtores de AIA (mesmo em baixos níveis, mas que fornecem continuamente esta auxina) pode ser um método auxiliar e vantajoso para a propagação *in vitro* de orquídeas raras ou ameaçadas. Sob esta perspectiva, o emprego de linhagens bacterianas para implementar a germinação e crescimento da espécie hospedeira poderão evidenciar novas metodologias para a produção de orquídeas tropicais.

Desde que diversas orquídeas estão em vias de extinção ou se encontram extintas em seu *hábitat* e várias nativas possuem amplo potencial de exploração comercial, a busca da otimização de protocolos para aquisição eficiente de plântulas vigorosas é regra para qualquer programa de reintrodução de espécies nativas ou rápida obtenção para fins ornamentais.

As técnicas utilizadas tradicionalmente para a propagação comercial de orquídeas (germinação de sementes em meio nutritivo asséptico) não preservam os microrganismos, dos quais esta família de plantas é altamente dependente. Avanços no conhecimento sobre germinação simbiótica e crescimento usando espécies nativas do Brasil com potencial de exploração comercial são necessários, pois esta tecnologia possibilitará maior conservação da diversidade de bactérias simbiontes.

Os objetivos deste estudo foram isolar e identificar bactérias do solo, rizosféricas e endofíticas associadas com espécies orquidáceas com relevância ecológica e econômica. Ainda, avaliou-se o efeito da inoculação de isolados produtores de auxinas em sementes da nativa *Cattleya walkeriana*, bem como a eficiência para o crescimento e sobrevivência durante a aclimatização *ex vitro* de plântulas germinadas de maneira assimbiótica *in vitro*.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II.1 A família Orchidaceae: características e potencial econômico

As orquídeas são uma das maiores famílias das plantas monocotiledôneas e podem ser encontradas em diversos *habitats*. Compreendem cerca de 850 gêneros, 25.000 espécies e representam por volta de 10% de todas as plantas com flores no mundo inteiro, sem considerar a quantidade de híbridos que tem sido criada (por volta de 100.000), superior a qualquer outro cultivo ornamental (ROBERTS e DIXON, 2008).

COZZOLINO e WIDMER (2005) estimaram que cerca de um terço do total de espécies desta família são polinizadas por engano por agentes polinizadores (insetos, principalmente). Estes autores postularam que a polinização por enganação é uma das razões chaves para a diversidade de características morfológica das flores e número de espécies das orquídeas. Como resultado de sua complexa interação ecológica com polinizadores e microrganismos, estas plantas são frequentemente os primeiros indicadores biológicos de decadência de um ecossistema (ROBERTS e DIXON, 2008).

As raízes das plantas da família Orchidaceae são fasciculadas e compostas por câmbio vascular, córtex e velame (ARDITTI, 1992). O velame é composto por 2 a 3 camadas de células lignificadas e podem ser tanto longas como curtas, sendo que as primeiras são geralmente células mortas quando atingem a maturidade e as células curtas são vivas. Esse órgão pode servir como fonte de reserva (água e nutrientes) e proteção (mecânica e reflexão da radiação solar), principalmente para raízes de orquídeas epífitas, as quais não possuem a proteção física do solo como as espécies terrestres (ARDITTI e ERNST, 1993). Somado a permeabilidade ao oxigênio e gás carbônico, o velame constitui-se em um importante nicho ecológico específico habitado por microrganismos associativos (TSAVKELOVA et al., 2007a).

As orquídeas são singulares entre as plantas em seus modos de nutrição, tendo um relacionamento direto e muitas vezes obrigatório com microrganismos muito distintos como bactérias e fungos. Associações bacterianas com orquídeas tem

demonstrado um complexo arranjo com bactérias do solo que vivem endofiticamente nas células radiculares e rizomas subterrâneos das espécies terrestres, com a bactéria fornecendo compostos reguladores de crescimento que promovem a germinação de sementes e crescimento de plântulas (WILKINSON et al., 1989; ROBERTS e DIXON, 2008).

As espécies tropicais são amplamente disseminadas dentro da horticultura, no entanto muitos *taxa* estão em vias de extinção e há a necessidade urgente de retirá-las desta condição (FARIA et al., 2001). Apesar da biodiversidade de espécies da flora brasileira, significativo número de orquídeas (34) estão ameaçados de extinção e outras 24 espécies ainda não foram somadas a lista por deficiência de dados, conforme a última listagem divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2008). Atribui-se a esta diminuição a coleta predatória e ao aumento das fronteiras agrícolas que retiram a floresta, seu *hábitat* natural, para pecuária ou cultivos agrícolas (COLOMBO et al., 2005).

A orquidicultura obteve recentemente um expressivo acréscimo de produtividade, principalmente pela introdução de novas tecnologias associadas a novas espécies e variedades disponibilizadas no mercado. Em decorrência desse avanço, grande incremento no comércio destas plantas tem sido observado dentro e fora do Brasil (TAKANE e YANAGISAWA 2007). Nos EUA, maior importador mundial, as vendas de orquídeas têm aumentado nos últimos anos, ao contrário de todas as outras culturas ornamentais e hoje ocupa a segunda colocação em produção e comércio de plantas de vaso (USDA, 2008).

Além do valor ornamental, sendo considerada a família de plantas com maior valor comercial (ROBERTS e DIXON, 2008), espécies orquídeas são apreciadas na medicina tradicional e diversos estudos farmacológicos validaram sua utilização etnobotânica. O extrato de *Cyrtopodium cardiochilum* apresenta propriedades imunológicas importantes no tratamento da tuberculose (BARRETO e PARENTE, 2006). Os caules de *Dendrobium* spp., empregados como alimentos saudáveis e medicinais na China, são ricos em ésteres e ácidos aromáticos simples com atividades antioxidantes, antitumorais e antimutagênicas (FAN et al., 2001; CHEN et al., 2008).

A utilidade de espécies desta família se estende para outros fins: a baunilha comercial, uma conhecida essência aromatizante e condimentar, é obtida a partir do fruto processado da orquídea *Vanilla planifolia* Andrews (DIVAKARAN et al., 2006); similarmente, na Turquia, tubérculos da terrestre *Orchis mascula* é utilizada para a fabricação de um extrato denominado salep o qual é usado na manufatura de sorvetes (ROBERTS e DIXON, 2008). Os rizomas de *Gastrodia cunninghamii* são reportados na literatura por ser um vegetal apreciado na culinária (HARRIS, 1997; citado por RASMUSSEN, 2002) e os tubérculos de *Satyrium nepalense* são consumidos como tônico energético na Ásia (MAHENDRAN e BAI, 2009).

II.1.1 Espécies terrestres utilizadas neste estudo

Cyrtopodium é um gênero neotropical predominantemente terrestre com cerca de 45 espécies encontradas desde o sul dos EUA ao norte da Argentina; sendo seu centro de distribuição o Cerrado Brasileiro, onde existem registradas 36, e diversas novas espécies têm sido descritas (BATISTA e BIANCHETTI, 2004; BATISTA et al., 2005; MENEZES, 2000). Apesar desta diversidade, 10 espécies deste gênero encontram-se na lista de espécies ameaçadas de extinção (SÃO PAULO, 2004).

Cyrtopodium paludicolum Hoehne (figura 1A), é uma orquídea terrestre típica do Centro-Oeste brasileiro, pode ser encontrada em regiões alagadiças ou próximo de brejos (BATISTA et al., 2005). Existe registro desta espécie vegetando também na região Sudeste, no Estado de São Paulo (MENEZES, 2000).

Oeceoclades maculata Lindl. (figura 1F) é uma erva terrestre nativa da África Tropical, Flórida (EUA), Panamá, América do Sul e Oeste da Índia (ACKERMAN, 1995, citado por OTERO et al., 2004). O gênero *Oeceoclades* possui cerca de 30 espécies com ampla ocorrência no continente africano (DRESSLER, 1993). Para o Brasil, é registrada apenas *Oeceoclades maculata*, que ocorre da Amazônia ao Rio Grande do Sul (PABST e DUNGS, 1975).



FIGURA 1. Espécies terrestres e epífitas investigadas neste. (A) Inflorescência racemosa de *Cyrtopodium paludicolum*; (B) *Ionopsis utricularioides* no hábitat, vegetando sob gravetos e galhos finos e (C) em inflorescência paniculada; (D) folha crassulácea e raízes com presença do velame em *Phalaenopsis amabilis*; (E) flor singular de *Cattleya walkeriana*; (F) inflorescência de *Oeceoclades maculata* e (G) inflorescência de *Vanilla planifolia*.

II.1.2 Espécies epífitas utilizadas neste estudo

Cattleya walkeriana Gardner (figura 1E) é de hábito epifítico e destaca-se na flora brasileira pela beleza de suas flores e o tamanho reduzido de seus órgãos vegetativos, características que despertam interesse de colecionadores e comerciantes (SILVA e MILANEZE-GUTIERRE, 2004). Conforme WENZEL (1990), *Cattleya walkeriana* é nativa da região central do Brasil, ocorrendo do Norte e Nordeste do Estado de São Paulo, Sul de Minas Gerais e Sudoeste de Goiás. É monofoliada, as flores são perfumadas e o labelo é panduriforme.

Ionopsis utricularioides Swartz Lindley (figura 1B e 1C) possui uma incidência maior, incluindo as Antilhas, Flórida (EUA), México, América Central, América do Sul tropical e Ilhas Galápagos (OTERO et al., 2004). Segundo MENEZES (1990), a espécie é de hábito epifítico, que vegeta, preferencialmente, sob galhos finos de arbustos, ao longo de cursos d'água ou de áreas alagadas do centro-oeste e sudeste brasileiro; é também de difícil cultivo, não se adaptando bem ao substrato usual (xaxim), porém, fora de seu *habitat*, é comprovadamente muito bem cultivada sob galhos de arbustos.

Phalaenopsis amabilis Lineu Blume (figura 1D) tem procedência no norte da Austrália, sudeste da Ásia, montanhas do Himalaia, Indonésia e Filipinas (SHEEHAN e SHEEHAN, 1994). Trata-se de uma planta epífita, monopodial de metabolismo CAM como folhas suculentas e 60 espécies descritas e que possui alto potencial ornamental e comercial, dentro e fora do Brasil, pois é uma das poucas plantas da família Orchidaceae que floresce a cada seis meses e apresenta grande durabilidade da inflorescência. Como consequência, esta orquídea tem obtido nos últimos anos grande popularidade no mundo inteiro (TAKANE e YANAGISAWA 2007).

O gênero *Vanilla* (figura 1G) compreende cerca de 110 espécies distribuídas pela América tropical do México ao Paraguai. A baunilha comercial, uma conhecida essência aromatizante e condimentar, é obtida a partir do fruto processado da orquídea *Vanilla planifolia* Andrews (DIVAKARAN et al., 2006). A essência da baunilha (vanilina) é um dos mais importantes condimentos no mundo todo, com mais de 37,525 ha cultivados e uma produção de 4.403 toneladas. No mercado mundial, a demanda pela vanilina

natural está crescendo entre 7 a 10% ao ano (DIVAKARAN et al., 2006). No entanto, muitas espécies são consideradas ameaçadas em suas áreas de ocorrência natural e há uma necessidade urgente de preservá-las (DIVAKARAN et al., 2006).

II.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

As pesquisas com microrganismos promotores de crescimento, embora tenham sido iniciadas no século XVIII, somente nos últimos 20 anos os seus efeitos benéficos sobre a planta e a sua diversidade genética começaram a ser entendidos. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP, ou PGPR em inglês) constituem um grupo heterogêneo de bactérias que podem ser encontradas na rizosfera, na superfície ou em associação com as raízes, e podem implementar a extensão ou qualidade do crescimento da planta de maneira direta ou indireta (AHMAD et al., 2008).

Tais estratégias podem ser via biocontrole de pragas e doenças, a exemplo da síntese de toxinas entomopatogênicas (GAO et al., 2008), antibióticos e sideróforos (MEHNAZ e LAZAROVITS, 2006); produção de hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, citocininas e poliaminas (CATTELAN e GRASSANO, 2007; SOLANO et al., 2008; TSAVKELOVA et al., 2006; CASSÁN et al., 2009b); produção de quitinases nocivas a nematóides (HALLMANN e al., 1998) ou aumento do “status” nutricional da planta por meio da solubilização de fósforo (PÉREZ et al., 2007) e fixação biológica de nitrogênio (LI et al., 2008), entre outros.

Ambientalmente, a utilização destes microrganismos pode ser preferível ao uso de fertilizantes e pesticidas, não somente ao menor custo e tempo, mas por contribuir com um sistema agrícola sustentável e a redução dos problemas associados ao uso de produtos químicos (CATTELAN e GRASSANO, 2007; AVIS et al., 2008; SOLANO et al., 2008).

Outra propriedade promissora desempenhada por RPCPs é seu auxílio na fitorremediação. As mesmas linhagens bacterianas capazes de incrementar a produtividade de algumas culturas são capazes também de atuar na biodegradação de

poluentes carcinogênicos e persistentes em ecossistemas, a exemplo do isolado *Enterobacter* sp. 12J1 capaz de remover o hidrocarboneto aromático pireno e colonizar plantas de milho e trigo (SHENG et al., 2008a).

Rizobactérias resistentes a metais pesados podem auxiliar a aquisição destes contaminantes de solos por meio do auxílio de crescimento de plantas fitorremediadoras (ZUANG et al. 2007), tais como a mostarda. Esta é uma importante estratégia para recuperar áreas contaminadas (com Cádmiio, Cobre, Chumbo e Níquel) devido às atividades antrópicas e por baixo dispêndio financeiro (RAJKUMAR e FREITAS, 2008);

Interações de orquídeas com seus fungos micorrízicos, essencial para a germinação de sementes, são investigados desde longa data (RAMUSSEN, 1995; citado por RASMUSSEN, 2002) e há relatos de efeitos sinérgicos da interação de micorrizas de orquídeas com bactérias produtoras de AIA. Entretanto, pouco é conhecido sobre a composição e atividade funcional de bactérias associativas; uma vez que rizobactérias podem desempenhar um favorável impacto para o crescimento e desenvolvimento de plantas (TILAK et al., 2005).

Conforme SOLANO et al. (2008), as futuras pesquisas com RPCP serão direcionadas para seleção destas rizobactérias (utilizadas individualmente ou em misturas) para auxiliar a solução de recentes problemas agrícolas tais como pesticidas altamente contaminantes e o cultivo em solos de baixa fertilidade. Neste contexto, a aplicação destas bactérias conduzirá a criação de alimentos funcionais, isto é, alimentos que possuem um efeito benéfico na saúde humana.

II.3 Hormônios vegetais e produção bacteriana de compostos reguladores do crescimento vegetal

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas e influenciam os processos fisiológicos. Constituem-se de moléculas pequenas (de 28 a 346 Da); possui efeito(s) específico(s); integram crescimento, desenvolvimento e todo o

metabolismo e, atuam em baixíssimas concentrações. Os hormônios vegetais podem ser classificados como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Outros autores incluem também brassinoesteróides, ácido jasmônico, ácido acetil salicílico e poliaminas (TAIZ e ZEIGER, 2004; KERBAUY, 2008).

Entre os hormônios vegetais, o AIA é a auxina natural mais comum encontrada em plantas. Sua função está relacionada ao alongamento de células, estimulando a síntese ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da membrana; ao passo que é responsável pela formação de raízes adventícias no caule e aumento da extensão nas raízes (TAIZ e ZEIGER, 2004). Acredita-se que seu efeito benéfico para o crescimento e morfologia da raiz seja pelo maior acesso à água e nutrientes do solo (VESSEY, 2003).

Na década de 1930, no Japão, uma doença em plantas de arroz causada por um fungo do gênero *Gibberella* foi descoberta. Quando plantas jovens eram atacadas por esse fungo, tornavam-se anormalmente altas devido à substância liberada pelo fungo, que foi denominada giberelina. Estudos posteriores mostraram que substâncias semelhantes às produzidas pelo fungo *Gibberella* spp. estão presente normalmente nas plantas, onde controlam várias funções (MALONEK et al., 2005), entre elas a quebra da dormência de sementes e alongamento caulinar (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Estudos fisiológicos sugerem muitas ligações entre os hormônios vegetais. Diversos outros hormônios modulam ou são modulados pelos níveis de auxina (DEMASON, 2005). As citocininas assim chamadas porque estimulam a divisão celular (citocinese). São produzidas nas raízes e transportadas através do xilema para todas as partes da planta. Embriões e frutos também produzem citocininas (DEMASON, 2005).

Algumas rizobactérias são capazes de utilizar o composto 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como única fonte de nitrogênio por meio da ação da enzima ACC deaminase. ACC é o precursor imediato do hormônio vegetal etileno e sua biossíntese parte do aminoácido metionina (TAIZ e ZEIGER, 2004). Segundo GLICK et al. (1995), esta enzima pode estimular o crescimento vegetal e o crescimento de raízes, em particular, sequestrando e hidrolisando o etileno das sementes. Para a maioria das

sementes vegetais, o etileno estimula a germinação e quebra a dormência das sementes, como é o caso do amendoim (TAIZ e ZEIGER, 2004). Porém, se a concentração deste hormônio após a germinação for muito alta, a alongação das raízes assim como a fixação simbiótica de nitrogênio, em leguminosas, é inibida (JACKSON, 1991, citado por CATTELAN e GRASSANO, 2007).

Uma das rizobactérias de vida livre no solo mais reconhecidas por características promotoras de crescimento em plantas é o *Azospirillum brasilense*, a qual possui efeitos positivos em diversas gramíneas (BALDANI et al., 1997). Estas características são atribuídas à fixação biológica de nitrogênio e biossíntese de hormônios vegetais como auxinas, citocininas e giberelinas (TIEN et al., 1979). Inoculado com *Bradyrhizobium japonicum* E109, *Azospirillum brasilense* Az39 promoveu o crescimento inicial de plântulas de milho e soja (CASSÁN et al., 2009b). Ambas as bactérias foram capazes de produzir auxina (AIA), giberelina (GA3) e citocinina (Zeatina) em cultura líquida (CASSÁN et al., 2009b).

Recentemente, CASSÁN et al. (2009a) detectaram cadaverina, um hormônio vegetal da classe das poliaminas, no sobrenadante da cultura líquida de *Azospirillum brasilense* Az39 e relacionaram o efeito benéfico da inoculação bacteriana como agente mitigante para o estresse hídrico em plântulas de arroz. Este efeito foi desempenhado em parte pela produção do composto regulador do crescimento vegetal.

II.4 Produção bacteriana de auxinas

A produção microbiana de AIA é, em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada sob diversas vias biossintéticas. A razão pela qual muitas rizobactérias são capazes de produzir auxinas ainda é desconhecida. Alguns autores sugerem que estas bactérias possuem um metabolismo relacionado ao triptofano e que a biossíntese de AIA é uma detoxificação alternativa, enquanto outros propõem que auxinas possuem alguma função celular porque um claro relacionamento tem sido observado entre auxinas e os níveis de AMP cíclico, o qual regula uma série de

processos metabólicos (SOLANO et al., 2008). Ainda assim, uma visão mutualística desta interação pode ser correta, pois o fornecimento de auxinas promove o crescimento de plantas e, desta forma, há mais exudatos e mais nutrientes para a bactéria (SOLANO et al., 2008).

Adicionalmente a síntese de auxinas, microrganismos são também capazes de degradá-las. A capacidade de oxidação enzimática de AIA (com a formação de anthralinato) é exemplificada em *Bradyrhizobium japonicum* (JENSEN et al., 1995; TSAVKELOVA et al., 2006). Os tecidos radiculares são especialmente sensíveis a flutuações da concentração de AIA e o desenvolvimento do sistema radicular pode ser profundamente afetado por fontes exógenas deste hormônio vegetal, inclusive a microbiana (TANIMOTO, 2005). Neste contexto, microrganismos rizosféricos degradadores de AIA podem também ter um efeito positivo no crescimento de plantas (GRAVEL et al., 2007).

Além da produção em tecidos da planta, a síntese de AIA é difundida entre bactérias associadas à plantas. Neste aspecto, bactérias endofíticas e epifíticas dos gêneros *Gluconacetobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Actinomyces* spp., *Agrobacterium* spp., *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Curtobacterium* spp., *Herbaspirillum* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. e *Xanthomonas* spp. podem promover o crescimento vegetal (PATTEN e GLICK, 1996; TSAVKELOVA et al., 2006).

TSAVKELOVA et al. (2007b) confirmaram que isolados rizobacterianos proveniente de espécies orquidáceas – determinados bactérias associados a orquídeas – podem aumentar a produção microbiana de AIA em resposta ao AIA exógeno. Tal comportamento foi dependente do meio de cultura utilizado (sendo recomendado meio mineral como o meio Czapek em detrimento aos meios de cultura complexos) e foi também evidenciado que os microrganismos investigados não degradaram AIA ou utilizam esta auxina como substrato.

A biossíntese do AIA em algumas bactérias ocorre por meio de diferentes rotas biossintéticas (COSTACURTA et al., 1995; PATTEN e GLICK et al, 1996) (figura 2).

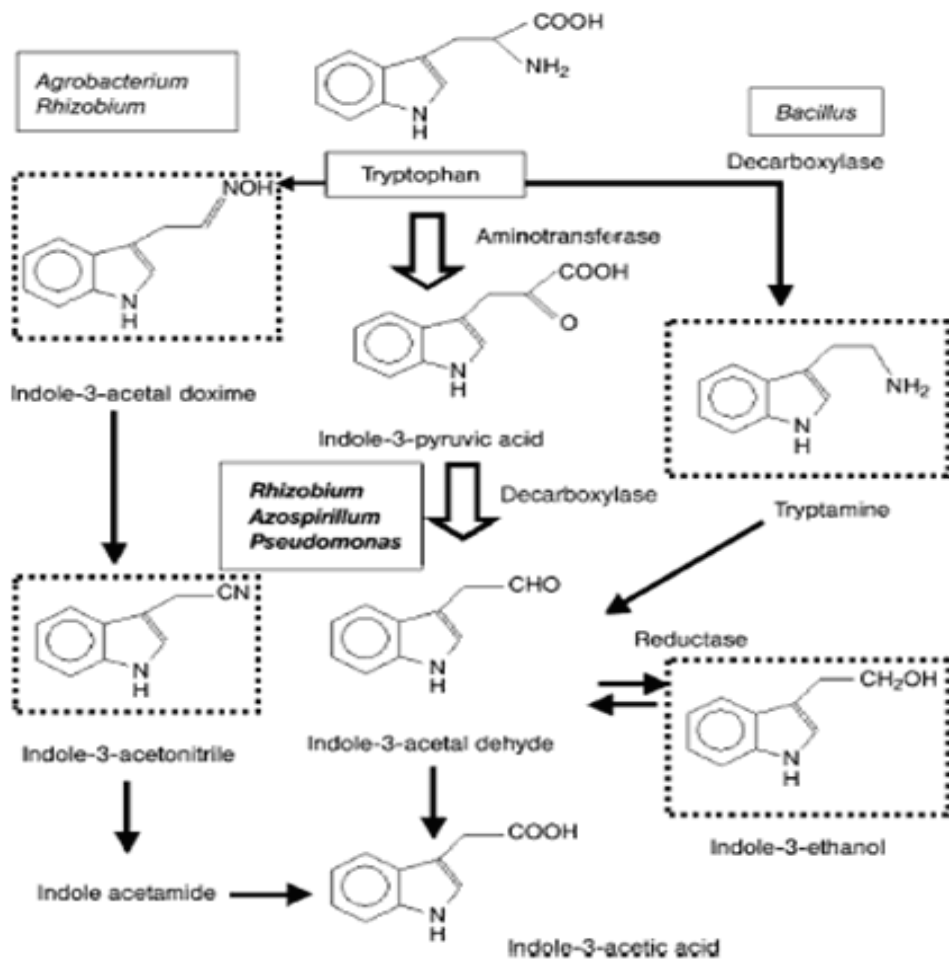


FIGURA 2. Rotas biossintética do Ácido 3-Indol-Acético (AIA) a partir do aminoácido triptofano em bactérias e plantas (proposto por SOLANO et al., 2008).

II.5 Benefícios atribuídos a bacterização de plantas

A inoculação de sementes e plântulas é uma técnica bastante difundida para a produção vegetal. Explorado inicialmente em plantas leguminosas, a utilização de RPCP como estirpes de bactérias conhecidas como rizóbios (pertencentes aos gêneros *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*) constituem um dos mais eficientes métodos de adubação para o mercado agrícola. Para a cultura da soja, em especial, a utilização de inoculante biológico substitui totalmente a aplicação de adubo nitrogenado mineral, fator que representa ao Brasil bilhões de dólares anualmente.

A aptidão de microrganismos estimularem a germinação e posterior desenvolvimento de plantas tem sido adaptada ao cultivo *in vitro* e *in vivo* de uma série de culturas agrícolas. Em especial para plantas micropropagadas, a bacterização durante a fase *ex vitro* de plântulas que foram manejadas em condições assépticas (que foram, portanto, privadas de microrganismos benéficos) apresentou-se altamente favorável para a sobrevivência em casa de vegetação.

Tais contribuições podem ser traduzidas em incremento da biomassa, maior aquisição de macronutrientes, biocontrole de fitopatógenos e resistência a estresses ambientais, com conseqüente redução da fase de aclimatização (NOWAK et al., 1998; MELLO et al., 2002; WEBER et al., 2003; THOMAS, 2004; AYYADURAI et al., 2006; GRAVEL et al., 2007).

A germinação *in vitro* de orquídeas pode ser um processo intensivo e dispendioso (HADLEY e HARVAIS, 1968; TSAVKELOVA et al., 2007b), além de que a aclimatização (estádio *ex vitro*) é ainda uma etapa com algumas dificuldades de sucesso (COLOMBO et al., 2005; CHEN, 2006).

TSAVKELOVA et al. (2007b) obtiveram significativa promoção para a germinação *in vitro* da espécie tropical *Dendrobium moschatum* por meio da bacterização com *Mycobacterium* sp. e *Sphingomonas* sp. isoladas desta mesma espécie hospedeira. A atividade promotora de crescimento foi observada na ausência de qualquer regulador vegetal ou fungo micorrízico, normalmente requerido para a germinação de orquídeas.

II.6 Identificação e caracterização molecular de microrganismos

Desde seu início, no final do século dezenove, a taxonomia bacteriana foi baseada em dados fenotípicos como morfologia de colônia e células, testes bioquímicos, fisiológicos e imunológicos. A taxonomia ganhou nova abordagem graças à descoberta da técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) em 1983 (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com sua utilização, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas. A biotecnologia ganhou um novo aliado para diversidade e classificações microbianas por meio de metodologias moleculares, pois o gene 16S é um excelente marcador uma vez que os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos. Seu papel funcional no sistema de processamento de informações deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucária (ATLAS e BARTHA, 1998).

O progresso das metodologias de biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente tem dado grande contribuição para o avanço do conhecimento em relação à diversidade microbiana (HEAD et al., 1998). A amplificação e sequenciamento de fragmentos do gene ribossomal 16S DNA é uma ferramenta segura, útil e bem aceita para a determinação e caracterização bacteriana (STACKEBRANDT et al., 2002). Resultados de estudos dependentes e independentes de cultivo demonstram que a diversidade de microrganismos - inclusive das rizobactérias - de amostras ambientais é ampla (PEREIRA et al., 2008).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Coleta de raízes e isolamento bacteriano

III.1.1 Amostras de raízes

As amostras de raízes de *Oeceoclades maculata* foram recolhidas de touceiras em uma mata nativa de uma propriedade particular próximo ao município de Jaboticabal - SP. Raízes de *Cattleya walkeriana* e *Ionopsis utricularioides* foram coletadas do acervo da casa de vegetação do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia – FCAV/UNESP.

Raízes de *Cyrtopodium paludicolum* e *Vanilla planifolia* foram retiradas de uma mata de ocorrência natural destas espécies, localizadas em uma propriedade rural particular situada no município de Ituverava – SP. Raízes da estrangeira *Phalaenopsis amabilis* foram recolhidas de plantas procedentes dos orquidários Machado (Itapetininga – SP) e Flora Tanda (Altinópolis – SP), produtores comerciais desta orquídea.

O tecido radicular foi colhido durante a primavera e verão (estações de crescimento vegetativo destas seis espécies). Como muitas orquídeas são plantas raras e em vias de extinção, as mesmas não foram totalmente desenraizadas. Duas a três raízes inteiras (de 7 a 15 cm) em pseudobulbos com mais de um ano foram cortadas com lâmina de bisturi estéril de três plantas sadias e vigorosas de cada espécie. Estas foram acondicionadas em frascos contendo tecido de algodão levemente umedecido (previamente esterilizado em autoclave) e armazenadas por não mais que 48 horas antes do procedimento seguinte (TSAVKELOVA et al., 2007a).

III.1.2 Isolamento, purificação e estocagem de linhagens bacterianas

O isolamento de bactérias do solo rizosférico foi conduzido a partir de amostras homogeneizadas de solo coletado próximo à superfície de raízes das espécies terrestres (*Cyrtopodium paludicolum* e *Oeceoclades maculata*). Estas amostras foram misturadas em solução salina autoclavada (NaCl a 0,85%) por meio de agitação em “shaker” (120 rpm) na proporção de 1g de solo para 100 mL de solução salina, durante 30 minutos, a fim de desagregar células e partículas do solo.

Em seguida, foi utilizada uma alíquota de 100 µL do sobrenadante para a realização de diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-7} , transferindo sucessivamente 100 µL da suspensão de cada diluição para 900 µL de solução salina em microtubos de centrífuga, antecedendo entre uma diluição e outra uma vigorosa agitação em agitador de tubos (vórtex). De cada diluição, alíquotas de 25 µL foram inoculadas em triplicatas em placas de Petri com meio de cultura Czapek ágar ou amido amônio nutriente ágar e homogeneizados com o auxílio de pérolas de vidro estéreis. Os respectivos meios de cultura apresentam a seguinte constituição:

- Meio Czapek ágar (MC): glicose, 20 g; fosfato de potássio dibásico K_2HPO_4 , 1,0 g; nitrato de sódio $NaNO_3$, 2,0 g; sulfato de magnésio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; cloreto de potássio KCl, 0,5 g; sulfato ferroso $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g; extrato de levedura, 0,5 g; ágar, 10 g; água deionizada q.s.p. 1.000 mL e,
- Meio amido-amônio nutriente ágar (MAAN): amido, 10 g; extrato de levedura, 0,5 g; fosfato de potássio dibásico K_2HPO_4 , 1,0 g; sulfato de magnésio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g; cloreto de sódio NaCl, 1,0 g; carbonato de cálcio $CaCO_3$, 3,0 g; sulfato de amônio $(NH_4)_2 SO_4$, 2,0 g; água deionizada q.s.p. 1.000 mL.

Depois de preparados, ambos meios tiveram pH ajustado para 6,8 (com HCl 1N ou KOH 1N) e foram autoclavados (a $121^\circ C$, 1 Kg.cm^{-2}) durante 20 minutos. Para prevenir o crescimento de fungos, cada meio de cultura foi suplementado com a solução antifúngica Ciclohexamida ($1,0\text{ mg mL}^{-1}$), a qual foi filtrada (em membrana

Millipore® com malha de 0,22 µm), adicionada aos mesmos e vertidos em placas de Petri, pouco antes da solidificação.

As porções de raízes foram lavadas em água de torneira corrente a fim de remover todo o substrato e lavadas em “shaker”, a 120 rpm, para remoção de partículas exógenas (na proporção de 1g de raiz para 100 mL de água destilada autoclavada) durante 30 minutos.

Para o isolamento de bactérias rizosféricas, as raízes foram cortadas em câmara asséptica em segmentos de 2-5 mm de comprimento, colocadas em um almofariz autoclavado e o tecido radicular macerado em solução salina para a realização de diluições seriada anteriormente descrita. Uma alíquota (50 µL) de cada diluição foi transferida aos meios Czapek ágar e amido-amônio nutriente ágar em triplicatas.

O processo de isolamento de rizobactérias endofíticas consistiu em desinfestar superficialmente as raízes, eliminar os microrganismos de solo e da parte externa da raiz, por meio da imersão em hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e etanol 70% por 1 minuto, seguindo-se de três lavagens sucessivas em água deionizada autoclavada. Esta metodologia de esterilização elimina eficientemente bactérias exógenas e fungos contaminantes enquanto mantem altos níveis de bactérias (WILKINSON et al., 1989). Logo após, as raízes foram fatiadas com o auxílio de lâmina de bisturi em pedaços de 1-2 mm, os quais foram transferidos para placas contendo os meios de cultura.

As placas foram em seguida incubadas em BOD a 30°C até que o aparecimento de colônias pôde ser detectado (TSAVKELOVA et al., 2007a). As colônias morfológicamente distintas (coloração, formato da borda, aparência seca ou gomosa, velocidade de crescimento) foram coletadas e purificadas por meio de diluições seriadas inoculadas em meio Czapek ágar (repetidas por três vezes consecutivas para certificação de colônias isoladas, riscadas e inoculadas novamente neste meio por três vezes para confirmação da pureza do isolado). Em seguida, as linhagens bacterianas purificadas foram criopreservadas para a manutenção de suas características genéticas (CATTELAN e GRASSANO, 2007), sendo para tanto

transferidas para meio Czapek líquido suplementado em 20% de glicerol e armazenadas em ultrafreezer a - 85°C.

III.2 Quantificação de Ácido Indol Acético (AIA) bacteriano

III.2.1 Ensaio colorimétrico para determinação de AIA

Os níveis de AIA secretados pelas bactérias no meio de cultura foram estimados cultivando-as em meio Czapek líquido suplementado com Triptofano (Merck). As culturas foram mantidas a 28°C, no escuro, sob agitação constante de 140 rpm durante 24 horas e 5 a 10% do inóculo bacteriano foi transferido para frascos de 20 mL contendo 5 mL do mesmo meio, suplementado com 200 µg mL⁻¹ de triptofano (1mM). Após o cultivo durante 48 horas, as culturas líquidas foram centrifugadas a 7.000g durante 10 minutos a 15°C e o sobrenadante coletado.

A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada conforme o protocolo de GORDON e WEBER (1951) com algumas modificações e consistiu da mistura de 2 mL de reagente de Salkowski (FeCl₃.6H₂O 2% + H₂SO₄ 37%) com 1 mL do sobrenadante da cultura, a qual foi reservada por 30 minutos em ambiente escuro para reação e manifestação de cor vermelha, mais intensa quando há maior quantidade de AIA.

A intensidade da cor foi determinada em um espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640) com leitura em 530 nm de absorbância, conforme ASGHAR et al., (2002). A concentração de compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão preparada com meio de cultura Czapek líquido e quantidades conhecidas do hormônio, as quais foram obtidas por meio de diluições de uma solução 1,0 mg mL⁻¹ de AIA comercial padrão (Sigma-Aldrich).

III.2.2 Extração e identificação de AIA e compostos indólicos

Culturas dos isolados RzW32, RzW35, EndW37, EndW48, EndW57 e EndW60 cresceram por 72 horas em meio líquido Czapek. As condições de incubação da cultura

e recuperação do sobrenadante foram conduzidas conforme especificado no item III.2.1. O sobrenadante recolhido foi filtrado (em membrana Millipore® com malha de 0,22 µm) em temperatura ambiente.

Para a análise de cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE a extração de AIA foi conduzida conforme o protocolo de TSAVKELOVA et al. (2007b) que consistiu da concentração a vácuo de 100 mL do sobrenadante da cultura líquida de cada isolado para um volume final de 10 mL em um aparelho liofilizador. Em seguida, o pH foi ajustado para 2,8 com HCl 1N, e extraído três vezes com acetato de etila (JT Baker, grau HPLC) (1:2, v:v) por meio de agitação vigorosa durante 10 minutos. De maneira similar as amostras, padrões de compostos indólicos Ácido Indol-Acético, Ácido Indol-Pirúvio, Ácido Indol-Lático e Ácido Indol-Acetaldeído (fornecidos pela Sigma) foram extraídos de meio de cultura Czapek com acetato de etila.

Após a separação das duas fases em um funil de decantação, a fração de acetato de etila foi evaporada em um rotoevaporador acoplado a uma bomba a vácuo, o resíduo sólido ressuspendido em 1 mL de metanol absoluto e centrifugado a 7000g durante 10 minutos. CLAE foi realizada por meio da injeção de 10 µL da alíquota em uma coluna de fase reversa HRC – ODS C18 4,6 x 25 cm (Shimadzu Co., Kyoto, Japão) conectada a um aparelho HPLC SLC 10A VP (Shimadzu) e a absorbância monitorada com detector UV visível (SPD m10A VP) em comprimento de onda de 254 nm.

A fase móvel foi constituída de água: acetonitrila: ácido acético (40:60:1), pH 2,8. A velocidade do fluxo foi 0,5 mL min⁻¹ e a pressão de operação 7,5 MPa. A confirmação de AIA foi feita por meio de comparação do tempo do pico de retenção do cromatograma de AIA comercial e compostos indólicos em meio Czapek extraído conforme o mesmo procedimento das amostras. A quantificação foi realizada por meio da comparação do peso de picos e áreas com o programa CLASS-VT (Shimadzu).

III.3 Ensaio para avaliação da atividade biológica de AIA bacteriano em sementes e raízes de orquídea

III.3.1 Inoculação em plântulas germinadas *in vitro* em fase de aclimatização *ex vitro*

Para avaliar o potencial promotor de crescimento dos isolados bacterianos foram obtidas plântulas de um cultivo assimbiótico *in vitro*, sendo eleita para este ensaio a espécie *Cattleya walkeriana*.

Cápsulas maduras e fechadas de sementes desta espécie foram desinfestadas no interior de câmara asséptica por meio de lavagem em solução de hipoclorito de sódio (1% de Cloro ativo) por 30 minutos e etanol 70% por cinco minutos. Em seguida, procedeu-se o enxágue em água destilada esterilizada por três vezes, sucessivamente.

No passo seguinte, as cápsulas foram abertas no sentido de sua deiscência com o auxílio de pinças e bisturi. Cerca de 0,01g de sementes foi inoculada em frascos de 300 mL contendo 40 mL de meio Knudson-C (KNUDSON, 1946) suplementado com carvão ativado (1%). Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura e luminosidade controladas (com temperatura de $25 \pm 2,0$ °C, luminosidade artificial de $75 \mu\text{mol}^{-1} \text{m}^{-2}$ e fotoperíodo de 16 horas luz) para germinação durante 90 dias.

Depois deste período, quando os protocormos apresentavam dois folíolos foram então repicados para meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade e suplementado com homogeneizado de banana (4%) e carvão ativado (1%), formulação indicada para crescimento *in vitro* desta espécie (GALDIANO JR., 2006), sendo mantido durante 60 dias quando foi novamente repicado para o mesmo meio e mantido até 230 dias após a semeadura, quando as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e inoculadas.

A preparação do inóculo das linhagens AIA positivos foi realizada após a confecção de curvas de crescimento das respectivas bactérias cultivadas em MC

suplementado de triptofano ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). Alíquotas (1mL) da cultura em crescimento foram retiradas em determinados intervalos de tempo (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 horas) e mediu-se a absorbância da cultura contra um comprimento de onda de 600 nm (em Biofotômetro) e as unidades Kletts em um aparelho Klett Summerson. A quantidade de AIA foi mensurada conforme detalhado no item 6.2.1. A quantidade de células foi determinada por diluições seriadas e plaqueamento de cada isolado no intervalo com maior produção bacteriana de auxina.

Depois de retiradas dos frascos, 200 plântulas (com características homogêneas) foram inoculadas com os isolados (RzW32, RzW35, EndW37 e EndW48) por meio da imersão do sistema radicular durante 30 minutos e infestação do substrato (composto de fibra de coco esterilizada e esfagno, proporção 1:1, v/v) com o respectivo isolado - 10 mL do inóculo para cada pote plástico de 200 mL de capacidade, oito cm de diâmetro por seis cm de altura - (MELLO et al., 2002). Um tratamento sem inoculação de microrganismos (com apenas água deionizada autoclavada) foi utilizado como testemunha.

O experimento consistiu de cinco tratamentos (isolados RzW32, RzW35, EndW37, EndW48 e testemunha). Cada tratamento consistiu de quatro potes com o substrato bacterizado e obteve 10 plântulas em um delineamento de blocos ao acaso. O experimento foi conduzido em casa de vegetação coberta com tela para retenção de 60% da luminosidade sob todas as partes e com vidro na superior e as regas foram diárias durante 90 dias, quando então foi avaliada a eficiência da inoculação de cada isolado por meio da análise da massa seca (parte aérea e radicular), número de folhas, área foliar, comprimento da maior raiz e índices de aumentos.

A área foliar foi mensurada em um aparelho LI300 Area Meter (Lincoln, Nebraska, EUA). Para avaliação da área foliar e massa seca total, foi utilizado o cálculo do índice de aumento por meio da fórmula: $IA = [(TR - T)/T]100$, em que TR = valor obtido para o tratamento, T = valor obtido para a testemunha, conforme proposto por SANTOS et al. (2005). Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) com o auxílio do programa estatístico Saeg (www.ufv.br/saeg), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

III.3.2 Inoculação de sementes e cultivo *in vitro*

Para a bacterização das sementes, cápsulas de *Cattleya walkeriana* foram desinfestadas conforme descrito no item III.3.1. Em cada tratamento, cerca de 500 sementes foram transferidas assepticamente para frascos de vidro (de 280 mL de capacidade) contendo 40 mL de meio Knudson-C (Knudson, 1946) suplementado com 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano para a indução da produção de AIA. Os isolados RzW32, RzW37, EndW57 e EndW60 foram cultivados por três dias antes que a suspensão bacteriana foi preparada (5×10^8 UFC mL^{-1}).

Após a inoculação, as sementes foram espalhadas pela superfície do meio Knudson-C. O delineamento experimental foi ao acaso com cinco repetições para cada tratamento. Todos os frascos foram mantidos em câmara de incubação a $25^\circ\text{C} \pm 2$ de temperatura e fotoperíodo de 16h.

Contagem do número de sementes germinadas e estágio da germinação foram conduzidos conforme prescrito na literatura (por meio de atribuição de valores de 0 a 5) mensalmente até 120 dias depois da semeadura (TSAVKELOVA et al., 2007b) e a avaliação estatística realizada conforme descrito no item III.3.1.

III.4 Identificação dos isolados bacteriano

III.4.1 Extração e quantificação de DNA genômico

Os isolados do solo, rizosféricos e endofíticos das seis espécies estudadas e que se mostraram bons produtores de ácido indolacético foram submetidos à análise molecular para a determinação taxonômica.

Dentre as bactérias selecionadas (por apresentar alta biossíntese de AIA), as células foram cultivadas em meio Czapek líquido durante 24 horas sob agitação de 140

rpm a 28 °C, centrifugadas a 10621g e o sobrenadante descartado. A extração do DNA foi feita conforme proposto por AUSUBEL et al. (1987), descrito a seguir:

As células foram ressuspensas em 50 µL de Lisozima (20 mg mL⁻¹) e 300 µL de tampão TE (pH 8,0). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por um período de 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 30 µL de SDS 10 % (p/v), 3,0 µL de Proteinase K (20 mg µL⁻¹) e novamente incubadas a 37°C por 30 minutos. À suspensão foi adicionada 100 µL de solução NaCl 5M e misturado, então adicionado 80 µL da solução CTAB (10%, p/v) mais NaCl (0,7M) e incubadas a 65°C por 10 minutos. Após esse período, foi adicionado 700 µL da solução Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1, v:v) e centrifugado a 10 621g por cinco minutos a temperatura ambiente. A fase superior (sobrenadante) foi coletada e transferida para um tubo limpo. Um volume de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1, v:v:v) foi adicionado e centrifugado a 10.621g por cinco minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e igual volume de isopropanol gelado adicionado, sendo então mantido a 20°C negativos durante duas horas e em seguida centrifugado a 20.817g por 30 minutos a 4°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v), e coletado por centrifugação a 15. 294g por 10 minutos a 4 °C. O etanol 70% foi removido tanto quanto possível, os tubos secos a temperatura ambiente em câmara de fluxo e o DNA ressuspensado em 50 µL de tampão TE contendo RNase (1,0 mg µL⁻¹), sendo após a digestão (incubação a 37°C, 30 minutos) armazenado em congelador (-20°C).

A visualização do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 11-14 com uma alíquota de 3 µL de DNA adicionada de 3 µL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol (v/v)] e conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 80 V constante. Para comparação, o marcador 1Kb DNA Ladder (Fermentas) foi utilizado. A revelação do gel foi realizada sob luz UV e a imagem visualizada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity One^R (Bio RadTM, Hércules, CA, EUA).

Para a quantificação em biofotômetro (Eppendorf[®]), o aparelho foi ajustado para

leitura de fita dupla de DNA e zerado com uma amostra de tampão TE. Posteriormente, foram lidas soluções contendo 98 μL de tampão TE e 2 μL da solução estoque de DNA a ser quantificado. Pureza e concentração de DNA foram estimadas por meio de leitura em D.O. a 260 nm e a razão 260/280 nm determinada.

III.4.2 Amplificação do gene 16S rRNA e documentação do produto amplificado

O gene 16S rRNA foi amplificado das linhagens isoladas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores universais fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991). A mistura da PCR consistiu de tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl]; 200 μM de cada desoxiribonucleotídeo; 2,5 mM de MgCl_2 ; 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador; 100 ng de DNA molde; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase; água milli-Q estéril para completar um volume final de 50 μL .

Os reagentes da amplificação por PCR foram fornecidos pela Fermentas (Lituânia). A reação de amplificação foi conduzida em termociclador Gene Amp PCR system (Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 3 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos (1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de hibridização a 56°C e 2 minutos de alongação a 72°C), e extensão final a 72°C durante 5 minutos. O produto de PCR esperado possui 1500 pb.

Para a confirmação do produto amplificado, uma alíquota de 4 μL de DNA (produto de PCR) adicionada de 3 μL de tampão de carregamento foi aplicada a um gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE contendo brometo de etídio. Para comparação, o marcador 1Kb DNA Ladder da Fermentas foi utilizado. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X durante 75 minutos, a 80V e a revelação do gel conduzida como descrita no item III.4.1.

III.4.3 Purificação e sequenciamento dos fragmentos 16S rRNA

O produto da amplificação por PCR foi purificado com auxílio da enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas), seguindo a recomendação do fabricante, que consistiu da adição de 1 µL da enzima SAP para 5 µL de produto de PCR (100 ng) e incubação a 37°C durante 15 minutos seguido de inativação da enzima com nova incubação a 85°C por mais 15 minutos.

As reações de seqüenciamento foram realizadas em microplacas de 96 poços empregando o kit “DNA Sequencing – DYEnamic ET Terminator” (Amersham Bioscience). As reações de seqüenciamento constaram de: 1,0 µL dos terminadores DYEnamic; 3,2 pmoles dos iniciadores (fD1 e rD1, individualmente); 50 ng de DNA molde (produto de amplificação 16S rDNA); 4,6 µL de tampão 2,5 X (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM MgCl₂); e completando-se a reação com H₂O milli-Q estéril para 10 µL.

A reação de seqüenciamento foi submetida a um termociclador Gene Amp PCR system (Applied Biosystems) com os ciclos: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, 40 ciclos (1 minuto de desnaturação a 94°C, 40 segundos de hibridização a 58°C e 1 minuto e trinta segundos de alongação final a 72°C).

Após a reação, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas em vórtex. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 3.220 *g*, por 45 minutos, a 20°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e as amostras foram reservadas por 5 minutos e invertidas em papel absorvente. Aos precipitados foram adicionados 150 µL de etanol 70%, centrifugadas a 3.220 *g* por 5 minutos, a 20°C. Esta última operação foi repetida por mais duas vezes e as amostras secas em fluxo laminar (temperatura ambiente) por 30 minutos.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9 µL Hi-Di Formamida – Catálogo – P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O sequenciamento dos amplicons foi realizado em um sequenciador capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystems).

III.4.4 Análise das sequências e homologia com banco de dados

Para se verificar a qualidade das sequências geradas utilizou-se o programa “Sequencing Analysis 3.4”, que gerou os eletroferogramas que foram submetidos à análise pelos pacotes Phred (EWING e GREEN, 1998; EWING et al., 1998), Phrap (www.phrap.org) e Consed (GORDON et al., 1998). A seleção das sequências adequadas foi realizada pelo programa Phred, o qual analisa a qualidade das sequências, visualizando graficamente pelo Consed e gerou arquivos no formato “fasta”, na qual o nível de exigência mínima foram de 400 bases com qualidade Phred acima de 20, auxiliado pelo programa “Contgen.pl”

Para análise comparativa com sequências homólogas, o programa “blastN” do banco de dados do *Nacional Center for Biotechnology Information* (sítio do NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foi utilizado.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Coleta de raízes e isolamento bacteriano

Ao total, 85 isolados foram purificados e estocados das seis orquídeas em estudo (tabela 1). Este número provavelmente não revela a quantidade real, pois foram “selecionadas” bactérias capazes de metabolizar e ser cultivada nos meios de cultura utilizados (MC e MAAN). Tais limitações são deficiências das pesquisas baseadas em métodos de cultivo; no entanto, estes métodos fornecem indicações parciais da estrutura da comunidade bacteriana.

TABELA 1: Quantidade de bactérias isoladas de cinco orquídeas brasileiras e uma estrangeira em meio Czapek ágar e Amido Amônio Nutriente ágar.

Espécie Hospedeira	Origem	N° de Isolados
	Solo	27
<i>Cyrtopodium paludicolum</i>	Rizosfera	3
	Endofítico	2
<i>Oeceoclades maculata</i>	Solo	6
	Rizosfera	6
	Endofítico	2
<i>Cattleya walkeriana</i>	Rizosfera	6
	Endofítico	7
<i>Ionopsis utricularioides</i>	Rizosfera	5
	Endofítico	5
<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Rizosfera	7
	Endofítico	1
<i>Vanilla planifolia</i>	Rizosfera	4
	Endofítico	4
Total de isolados:		85

A quantidade de bactérias isoladas do solo, rizoplano e endofíticas foi diferente e apresentou-se variada entre as seis espécies investigadas. Este fato deve-se, provavelmente, a fatores ambientais e condições do *hábitat* e cultivo destas orquídeas. Em um dos estudos pioneiros de isolamento de bactérias associadas a raízes de orquídeas, WILKINSON et al. (1989) mostraram que a abundância bacteriana varia com a estação do ano, espécies e idade dos tecidos da raiz; além de que a diversidade destes procariotos pode ter relação com o táxon do hospedeiro.

A colonização microbiana das raízes de plantas é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos, como composição de exudatos (carboidratos, ácidos orgânicos e vitaminas), nutrientes inorgânicos, competição, temperatura, pH e tipo de solo (BAIS et al., 2004; KAMILOVA et al., 2006; SOLANO et al., 2008). No mais, plantas da família Orchidaceae são conhecidas por produzir vários compostos fenólicos e fitoalexinas, os quais podem suprimir a proliferação de alguns microrganismos (STOESSL e ARDITTI, 1984).

O número de bactérias endofíticas isoladas de espécies epífitas foi ligeiramente superior ao encontrado nas terrestres (*Cyrtopodium paludicolum* e *Oeceoclades maculata*). Maior diversidade e quantidade de células bacterianas associativas podem ser encontradas em orquídeas de hábito epifítico e uma hipótese é que o velame esponjoso atua como um favorável *hábitat* para bactérias (TSAVKELOVA et al., 2007a).

É perceptível maior número de isolados (27) obtidos a partir do solo de *Cyrtopodium paludicolum*, a qual habita áreas que permanecem alagadas durante boa parte do ano (MENEZES, 2000). Grande diversidade bacteriana pode ser isolada do solo rizosférico de plantas hospedeiras que vivem com raízes submersas, tal como o arroz de várzea (MUTHUKURAMASAMY et al., 2007), pois áreas alagadas constituem ambientes favoráveis à presença de diazotróficos devido à inundação com água na cultura (condição microaerofílica) e a decomposição abundante.

IV.2 Detecção e quantificação de Ácido Indol Acético bacteriano

IV.2.1 Quantificação por colorimetria

A reta padrão para comparação da absorvância colorimétrica da quantidade de AIA produzido pelos isolados bacterianos constou de cinco concentrações de AIA comercial (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e gerou a equação $y = 0,016x + 0,3077$, com $R^2 = 0,9845$ (figura 3), em que “y” representa a quantidade de auxina secretada na cultura líquida.

O ensaio colorimétrico com o emprego da solução de Salkowski permitiu identificar e quantificar os isolados capazes de produzir auxinas pela manifestação de cor vermelha (Figuras 4 e 5).

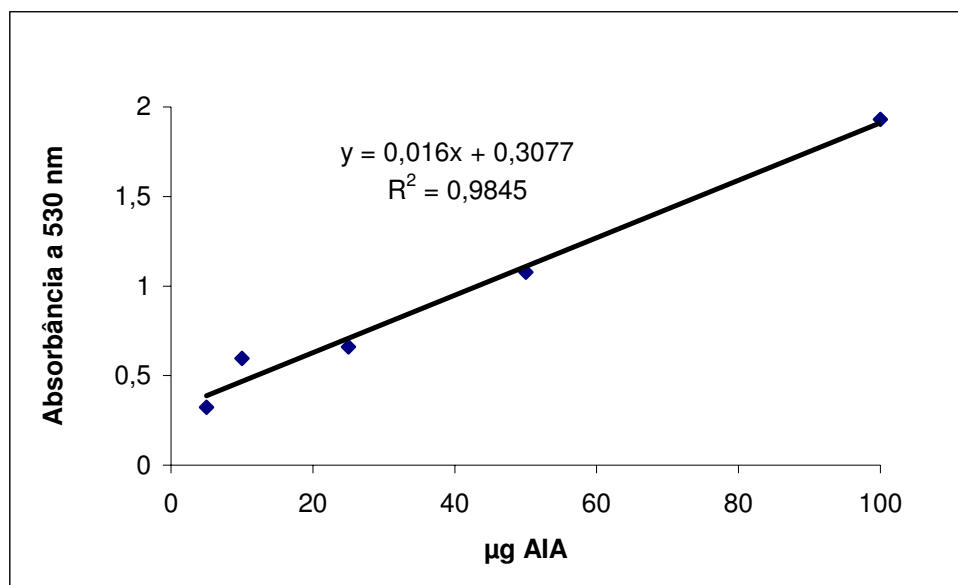


FIGURA 3. Equação da reta dos padrões de concentrações de AIA comercial.



FIGURA 4. Padrões de concentrações de AIA comercial. 1 – Controle negativo (apenas meio Czapek e solução de Salkowski); 2 – $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; 3 – $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; 4 – $5 \mu\text{g mL}^{-1}$; 5 – $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; 6 – $25 \mu\text{g mL}^{-1}$; 7 - $50\mu\text{g mL}^{-1}$; 8 – $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA.

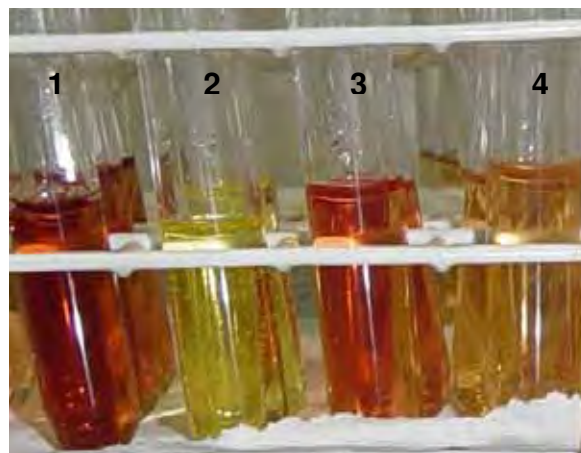


FIGURA 5. Quantificação de AIA utilizando o reagente de Salkowski, em que a maior tonalidade de vermelho evidencia a maior concentração de auxina. Isolados 1 – EndW57; 2 – RzW33; 3 – EndW37 e 4 – RzW35.

Para a seleção de bactérias produtoras de AIA foram testados todos isolados bacterianos (85), resultando em 67 linhagens com capacidade de produção de diferentes concentrações desse hormônio (tabela 2).

TABELA 2: Produção de AIA por isolados bacterianos em meio Czapek Líquido suplementado com DL-triptofano ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) após 48 horas de incubação.

N°	Espécie	Localização	Código do isolado	AIA* $\mu\text{g mL}^{-1}$	AIA* $\mu\text{g DO}^{-1}$		
1	<i>Cyrtopodium paludicolum</i>	Solo	SIC1	ND ^a	-		
2			SIC2	$1 \pm 0,02$	3,3		
3			SIC3	$1,53 \pm 0,06$	1,2		
4			SIC4	$10,5 \pm 0,35$	4,8		
5			SIC5	ND	-		
6			SIC6	$2,36 \pm 0,08$	2,9		
7			SIC7	ND	-		
8			SIC8	$100,8 \pm 4$	93,4		
9			SIC9	ND	-		
10			SIC10	$2,1 \pm 0,12$	1,8		
11			SIC11	$1,1 \pm 0,02$	3,3		
12			SIC12	$1,4 \pm 0,02$	5,6		
13			SIC13	ND	-		
14			SIC14	ND	-		
15			SIC15	ND	-		
16			SIC16	$24,4 \pm 1,1$	18,8		
17			SIC17	$4,8 \pm 0,6$	3,4		
18			SIC18	$11,2 \pm 0,3$	16,9		
19			SIC28	ND	-		
20			SIC29	$9,5 \pm 0,3$	6,9		
21			SIC30	ND	-		
22			SIC42	$6,2 \pm 0,7$	9,7		
23			SIC43	$19,2 \pm 0,5$	31,3		
24			SIC44	$9 \pm 0,4$	5,8		
25			SIC45	ND	-		
26			SIC46	$15,7 \pm 0,4$	32,5		
27			SIC47	$9,6 \pm 0,8$	5,7		
28			Rizosfera		RzC19	$1,4 \pm 0,06$	2,6
29					RzC20	ND	-
30					RzC21	ND	-
31			Endofítico		EndC22	ND	-

Continua na próxima página

N°	Espécie	Localização	Código do isolado	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	AIA $\mu\text{g DO}^{-1}$
32	<i>C. paludicolum</i>		EndC23	$0,4 \pm 0,01$	1,1
33	<i>Vanilla planifolia</i>	Rizosfera	RzV24	$6,7 \pm 0,1$	8,3
34			RzV25	$10 \pm 0,9$	21,4
35			RzV26	$12 \pm 2,1$	25,6
36			RzV27	$4 \pm 0,2$	4,5
37		Endofítico	EndV38	$1,5 \pm 0,1$	15,6
38			EndV39	$4,1 \pm 0,3$	17,4
39			EndV40	$19,7 \pm 1,5$	21,3
40			EndV41	ND	-
41	<i>Cattleya walkeriana</i>	Rizosfera	RzW31	$2,4 \pm 0,1$	5,67
42			RzW32	$22,2 \pm 1,9$	28,2
43			RzW33	ND	-
44			RzW34	$0,8 \pm 0,02$	1,72
45			RzW35	$10,7 \pm 0,4$	35,6
46			RzW36	ND	-
47		Endofítico	EndW37	$32,3 \pm 2,7$	82,8
48			EndW48	$18 \pm 0,2$	38,5
49			EndW57	$42,4 \pm 2,1$	70,1
50			EndW58	$19,3 \pm 0,9$	27,6
51			EndW59	$11 \pm 0,6$	28,7
52			EndW60	$25,6 \pm 1,9$	27,8
53			EndW61	$6,3 \pm 1,5$	35,4
54	<i>Phalaenopsis amabilis</i>	Rizosfera	RzP49	$7 \pm 0,35$	5,1
55			RzP50	$3 \pm 0,04$	6,3
56			RzP51	$2 \pm 0,1$	1,6
57			RzP52	$5 \pm 0,3$	14,5
58			RzP53	$5,1 \pm 0,04$	13,8
59			RzP54	$2,5 \pm 0,03$	1,9
60			RzP55	ND	-
61		Endofítico	EndP56	$3 \pm 0,1$	14,2
63	<i>Ionopsis utricularioides</i>	Rizosfera	Rzl63	$26,6 \pm 0,5$	19
64			Rzl64	$55,64 \pm 1,3$	37
65			Rzl66	$36,3 \pm 1,2$	19,8
66			Rzl67	$8,6 \pm 0,2$	6,9

Continua na próxima página

N°	/Espécie	Localização	Código do isolado	AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$	AIA $\mu\text{g DO}^{-1}$
67	<i>Ionopsis utricularioides</i>	Endofítico	EndI65	ND	-
68			EndI68	$2 \pm 0,2$	3,6
69			EndI69	$28 \pm 1,0$	16,9
70			EndI70	$6,4 \pm 0,2$	4,8
71			EndI71	ND	-
72	<i>Oeceoclades maculata</i>	Solo	SIO72	$1,9 \pm 0,18$	2,3
73			SIO73	$36 \pm 0,98$	34,1
74			SIO74	ND	-
75			SIO75	ND	-
76			SIO76	$3,15 \pm 0,45$	2,7
77			SIO84	$8 \pm 1,6$	12,7
78		Rizosfera	RzO77	$2,25 \pm 0,1$	5,4
79			RzO78	ND	-
80			RzO79	$23,8 \pm 1,7$	21,7
81			RzO80	$6 \pm 0,4$	5,3
82			RzO83	$2 \pm 0,3$	4,5
83		Endofítico	RzO82	$1,9 \pm 0,15$	5,1
84			EndO81	$61,4 \pm 1,9$	48,4
85			EndO85	$1,5 \pm 0,01$	3,4
86		<i>H. seropedicae</i>	(CP) ^b	Br11.417	$105,7 \pm 4,3$
87	<i>Azospirillum brasilense</i>	(CP)	Abv5	$42,5 \pm 1,2$	28,4
88	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	(CN) ^c	SEMIA 587	$4,1 \pm 0,6$	6,6

*Valores de médias de três experimentos independentes em triplicata para cada isolado \pm desvio padrão.

^aND = Não detectado

^bCP = Controle positivo

^cCN = Controle negativo

Do total de bactérias AIA positivo entre os isolados das orquídeas investigadas, *Cyrtopodium paludicolum* obteve 65,62%; *Vanilla planifolia*, 87,5%; *Cattleya walkeriana*, 84,6%; *Phalaenopsis amabilis*, 87,5%; *Ionopsis utricularioides*, 80% e *Oeceoclades maculata*, 78,57%, apresentando ampla distinção da quantidade deste hormônio. Este

percentual está próximo do preconizado por SOLANO et al. (2008), os quais afirmaram que 80% das bactérias do solo e rizosfera são capazes de produzir auxinas.

Os exudatos vegetais podem suplementar a rizosfera com triptofano (KRAVCHENCO et al., 2004; KAMILOVA et al., 2006). Utilizando este aminoácido dos exometabólitos radiculares, a microflora na raiz pode alterar a concentração hormonal da rizosfera pela transformação deste aminoácido em AIA, o qual pode influenciar a planta hospedeira em contrapartida.

A produção *in vitro* deste hormônio por bactérias é diretamente proporcional a quantidade de triptofano, que tem sido avaliada em concentrações de 0 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (TIEN et al., 1979; PARK et al., 2005; TSAVKELOVA et al., 2005, 2007b; AHMAD et al., 2008). Para uma comparação mais conveniente com dados publicados de isolados de raízes de orquídeas, a concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi adotada, bem como a quantidade de AIA sintetizada recalculada pela densidade óptica a 600 nm (densidade de células) (tabela 2).

Os níveis de auxinas produzidos pelos isolados testados neste estudo foram relativamente similares entre as comunidades microbianas destas espécies terrestres e epífitas. As quantidades de AIA secretados na cultura líquida foram entre 0,8 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ligeiramente superiores aos encontrados na literatura por TSAVKELOVA et al. (2005; 2007a), com produção de 0,5 a 92,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de auxina por bactérias isoladas de orquídeas tropicais.

Procurou-se, sem sucesso, obter linhagens rizobacterianas isoladas de orquídeas para comparação com os dados deste trabalho. Assim, utilizou-se as linhagens Br 11.417 e Abv5, que pertencem as espécies *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*, respectivamente. Tais linhagens são produtoras de AIA isoladas de outras espécies monocotiledôneas (arroz e milho) e foram gentilmente fornecidas pela Embrapa Agrobiologia (CNPAB – Seropédica/RJ). Como controle negativo, foi empregado *Bradyrhizobium elkanii*, SEMIA 587, promotora de crescimento para a cultura da soja devido a fixação simbiótica de Nitrogênio, mas catabolizadora de AIA (JENSEN et al., 1995).

IV.2.2 Detecção de AIA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a identificação e quantificação mais precisa de AIA e compostos indólicos, um ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi conduzido para os isolados RzW32, RzW35, EndW37, EndW57 e EndW60. Os cromatogramas constam na figura 6 e a quantificação de compostos indólicos.

A partir da comparação dos picos de retenção em espectro UV dos padrões de compostos indólicos foi possível detectá-los no extrato de acetato de etila dos isolados. AIP e AIA apresentaram praticamente o mesmo tempo de retenção e estão presentes em cinco das seis rizobactérias analisadas (figura 6 A,B,C,D e F).

Apenas nos isolados *Curtobacterium* sp. EndW57 e *Bacillus* sp. EndW60 foi verificado a presença de AIL e AIAld, intermediários da via biossintética de AIA. EL-KAWAS e ADACHI (1999) não detectaram AIAld após 24 horas de incubação da bactéria *Klebsiella pneumoniae* utilizada em ensaio CLAE logo após a extração, fator que pode ter ocasionado tais resultados.

Ácido Indol Lático foi o composto encontrado em maior quantidade no sobrenadante de *Curtobacterium* EndW57. O mesmo composto não foi encontrado no sobrenadante de *Curtobacterium* RzW35. TSAVKELOVA et al., (2007b) detectaram este composto indólico na cultura de vários isolados de bactérias associadas a orquídeas, mas não na espécie *Microbacterium* sp.

Diferenças entre as quantidades de AIA secretadas na cultura líquida dos isolados foram verificados entre os ensaios de colorimetria e CLAE. Entre as duas metodologias houve diferenças de até 4 vezes para a mesma bactéria. CROZIER et al. (1988), ao comparar a produção de auxinas na cultura de *Azospirillum* spp. encontraram dramáticas diferenças para a quantificação de AIA entre as duas técnicas (superiores a 50 vezes) na mesma circunstância em que a CLAE revelou AIA em linhagens não detectadas por colorimetria. Isto pode ser atribuída ao fato de que outros compostos indólicos (envolvidos na biossíntese bacteriana da auxina), que estão acumulados na cultura, são mais reativos que AIA sozinho para a solução de Salkowski (TSAVKELOVA et al., 2007b).

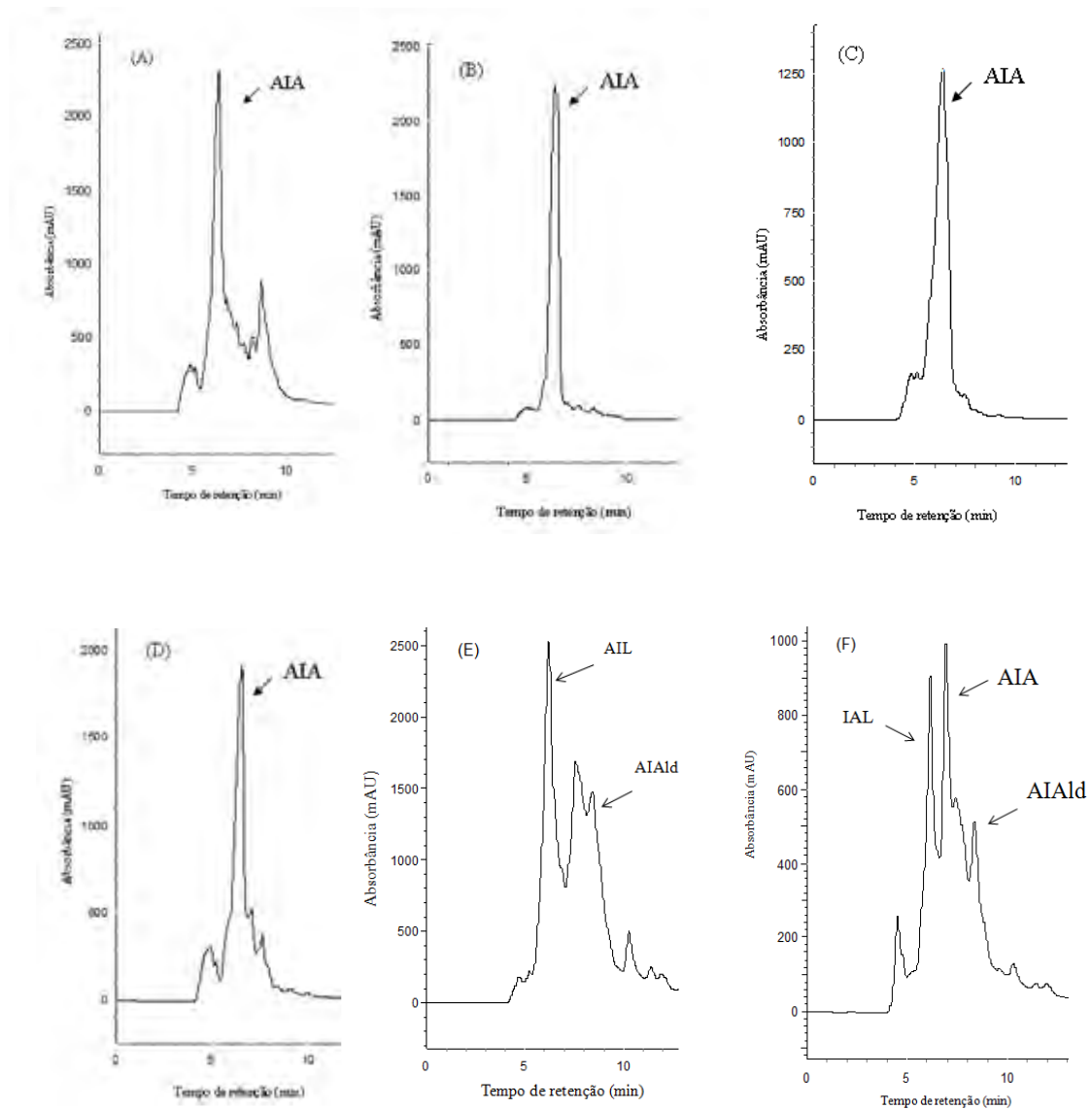


FIGURA 6: Detecção de compostos indólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no sobrenadante da cultura líquida das rizobactérias: (A) *Burkholderia* sp. isolado RzW32; (B) *Curtobacterium* sp. isolado RzW35; (C) *Enterobacter* sp. isolado EndW37; (D) *Bacillus* sp. isolado EndW48; (E) *Curtobacterium* sp. isolado EndW57 e (F) *Bacillus* sp., isolado EndW60.

IV.3 Ensaio para avaliação da inoculação de bactérias produtoras de auxinas em orquídeas

Para estimar a eficiência dos isolados foi necessário conhecer o comportamento de crescimento de cada bactéria e contrastá-la com a produção de auxinas, a fim de encontrar a melhor fase para inoculação.

Para tanto, foi preciso confeccionar curvas de crescimento (densidade de células em relação ao tempo). Devido ao grande número de isolados AIA positivos neste estudo, foram selecionadas cinco bactérias com diferentes produções de AIA e isoladas da epífita *Cattleya walkeriana*, a qual foi utilizada para bioensaios.

A figura 6 apresenta a dinâmica de crescimento e a produção de AIA na cultura bacteriana dos isolados RzW32, RzW35, EndW37, EndW48, End W57 e EndW60. Foi possível confirmar que o AIA bacteriano é produzido durante a fase estacionária do crescimento, conforme tem sido relatado na literatura (TIEN et al., 1979; TSAVKELOVA et al., 2005). Pelo fato de ser um metabólito secundário bacteriano, há a necessidade de maior número de células desenvolvidas para produzir AIA. Os períodos de crescimento celular escolhidos para as inoculações dos cinco isolados oscilaram entre 18 a 22 horas.

Os isolados apresentaram produção de AIA inferior aos averiguados anteriormente e este fato pode ser responsabilizado pela estocagem e as sucessivas repicagens em meio de cultura que podem ter contribuído para que as linhagens tenham reduzido seu comportamento sem contato com a planta hospedeira e as razões para este comportamento ainda não são claros (GYANESHWAR et al., 2001). TSAVKELOVA et al. (2007a) mostraram que a produção bacteriana de AIA pode ser reduzida ou mesmo nula após a estocagem e conservação em óleo mineral durante seis meses; os mesmos autores advertiram que a biossíntese bacteriana de AIA pode não se manter constante.

A partir de oito meses de cultivo *in vitro* (cultivo assimiótico) de sementes de *Cattleya walkeriana*, foi obtido um número suficiente de plântulas com características homogêneas (figuras 8A e 8B) para a avaliação *ex vitro* após 90 dias de cultivo em casa

de vegetação (figura 8C). Um ensaio com bacterização de sementes (figura 9) também foi investigado.

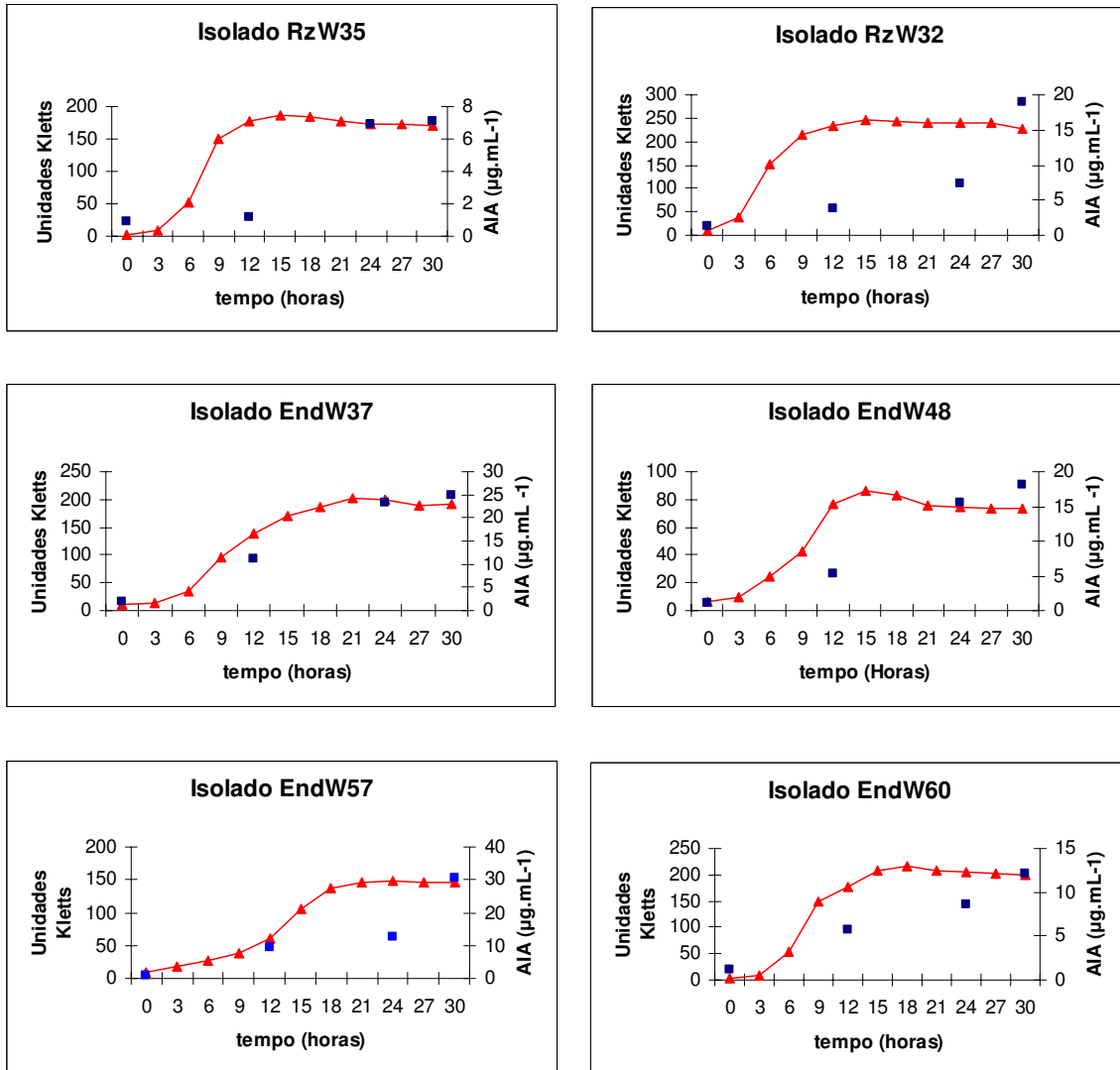


FIGURA 7: Dinâmica de crescimento e produção bacteriana de AIA na cultura líquida dos isolados utilizados nos bioensaios. O tempo está expresso em horas (a cada três horas), a curva de crescimento foi determinada conforme os valores em unidades Kletts (representados por triângulos e linha vermelhos). A concentração de AIA em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (quadrados azuis) biossintetizada na cultura foi quantificada no momento do estabelecimento da cultura e após os intervalos de 12, 24 e 30 horas.

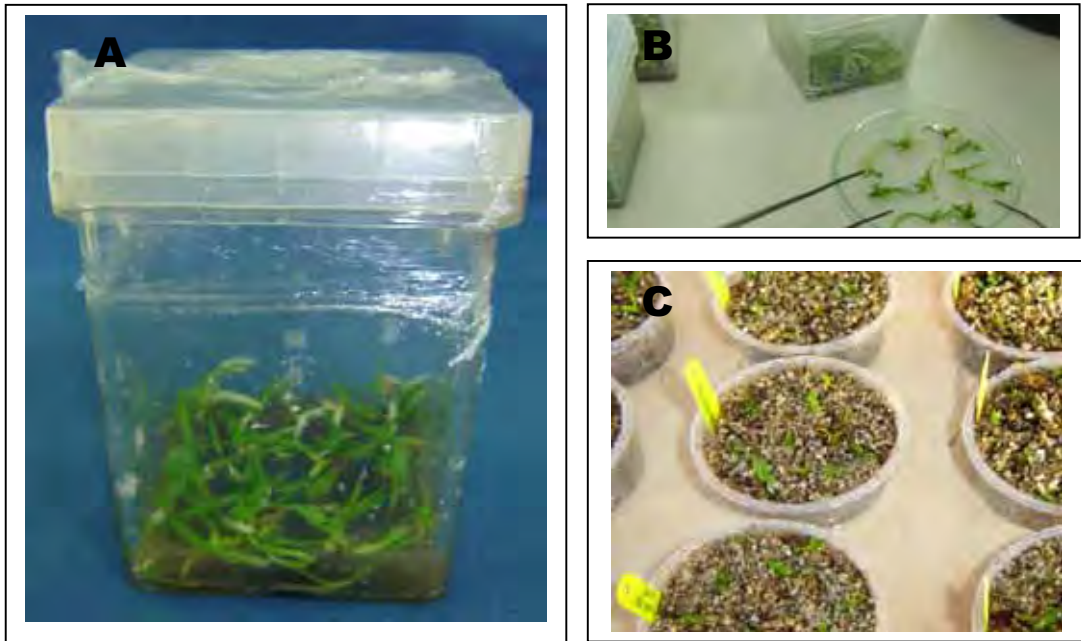


FIGURA 8: Plântulas de *Cattleya walkeriana* obtidas em cultivo assimbiótico ao final do estágio *in vitro* (A), plântulas homogêneas para a inoculação (B) e cultivadas em casa de vegetação (*ex vitro*) (C).

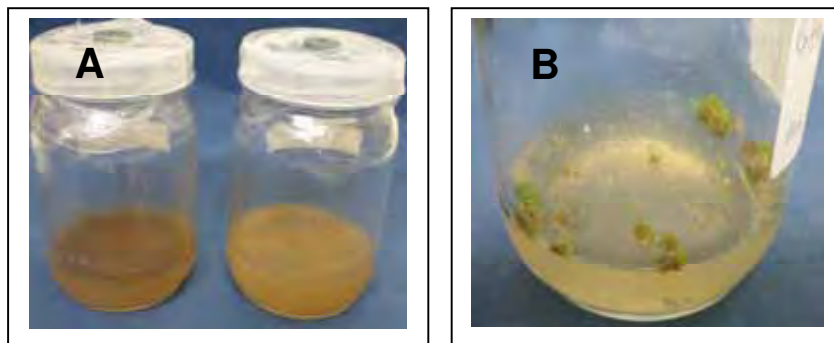


FIGURA 9: Inoculação de sementes de *Cattleya walkeriana*. Expressivo crescimento bacteriano no meio nutritivo Knudson-C com sementes (A) e formação dos protocormos em sementes do controle não inoculado (testemunha) após 90 dias em câmara de incubação (B).

IV.3.1 Inoculação em sementes de *Cattleya walkeriana*

Culturas dos isolados produtores de AIA *Burkholderia* sp. RzW32, *Enterobacter* sp. EndW37, *Bacillus* EndW57 e *Bacillus* sp. EndW60 tiveram sua habilidade para promover a germinação e crescimento inicial de *Cattleya walkeriana* avaliados. O experimento foi conduzido em condições *in vitro* utilizando meio sólido e, portanto, bactérias estiveram em contato direto com a semente.

No caso de *Curtobacterium* sp. EndW57 foi verificada excessiva produção de muco e cobriu as sementes com grossa camada, não foi verificada nenhum indício de germinação de sementes (figura 9a). Nos demais tratamentos inoculados com os três isolados foram verificados atraso para os primeiros indícios de germinação. Em contraste, sementes do tratamento controle apresentaram protocormos bem desenvolvidos ao final do mesmo período (tabela 3).

TABELA 3: Influência da inoculação de isolados rizobacterianos para a germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya walkeriana* (modificado de STEWART et al., 2003).

Tratamentos	Dias de incubação					Sementes germinadas (%)
	15	30	60	90	120	
Testemunha	1 ^a	2	2	3	4	12,5 ± 2,5
RzW32	0	0	0	0	1	0
EndW37	0	0	0	0	1	0
EndW57	0	0	0	0	0	0
EndW60	0	0	0	0	1	0

^a0 - Sementes intactas e sem início de germinação; 1 - embrião com rompimento da testa (início de germinação); 2 – protocormo em fase inicial de crescimento; 3 - protocormo evidente, desenvolvido e com radículas; 4 - emergência do primeiro folíolo verde; 5 - desenvolvimento de folíolos e raízes evidentes.

Linhagens de RPCP podem promover a germinação e formação de raízes na espécie de orquídea hospedeira durante simbiose com micorrizas (WILKINSON et al., 1989 e 1994a) ou mesmo na ausência destes fungos necessários para a germinação simbiótica de plantas desta família (TSAVKELOVA et al., 2007b). O mesmo comportamento não foi verificado neste ensaio de inoculação em sementes de *Cattleya walkeriana*.

Alguns hormônios vegetais são biossintetizados por diversos gêneros bacterianos (TIEN et al., 1979; TSAVKELOVA et al., 2006; CASSÁN et al., 2009a e b). O balanceamento fisiológico entre auxinas com giberelinas ou citocininas e possíveis substâncias tóxicas produzidos por rizobactérias podem suprimir a germinação *in vitro* de orquídeas (WILKINSON et al., 1994a). Ainda, o importante mecanismo bacteriano para a colonização e patogenicidade é normalmente dependente da densidade de células e relacionado ao fenômeno *quorum-sensing* (um sofisticado sistema de comunicação que regula a expressão gênica por meio da produção de pequenas moléculas sinalizadoras autoindutoras) (POONGUZHALI et al., 2007).

Alem da produção de AIA, outras substâncias com características inibitórias para as sementes podem ter sido sintetizados pelos isolados avaliados e desencadeado o atraso para a germinação.

IV.3.2 Inoculação em plântulas germinadas *in vitro* e aclimatização *ex vitro*

Os isolados *Bacillus* sp. EndW48 e *Enterobacter* sp. EndW37 apresentaram as maiores porcentagens de sobrevivência, superiores ao tratamento testemunha. Entretanto, as rizobactérias *Burkholderia* sp. RzW32 e *Curtobacteria* sp. RzW35 apresentaram as maiores mortalidades (tabela 4). Em se tratando de microrganismos que habitam a rizosfera, estes resultados podem ser previsíveis uma vez que bactérias que oferecem prejuízos ou benefícios coexistem no mesmo nicho (SANTOS et al., 2005). Ainda, NEHL et al. (1996) atentaram ao fato de que isolados rizobacterianos

individuais podem flutuar de promotores a inibidores de crescimento conforme as condições ambientais, genótipo do hospedeiro e *status* micorrízico.

TABELA 4. Promoção de crescimento de plântulas de *Cattleya walkeriana* inoculadas com isolados rizobacterianos após aclimatização em casa de vegetação durante 90 dias.

Tratamento	AF (cm ²)	NR #	CMR (cm)	MSPR ------(mg)-----	MSPA	S ------(%)-----	IAAF	IAMST
Testemunha	4,7b*	2,47c	5,34c	23,36c	18,9c	60	0	0
RzW32	3,7b	2,57c	6,35bc	24,52bc	17d	57,5	0	7,61
RzW35	4,7b	2,85b	5,33c	24,12bc	18,3c	55	12	5,13
EndW37	8,5a	3,29 a	6,82a	39,28a	32,25a	75	178,9	77,33
EndW48	4,9b	3,24a	6,67ab	26,5b	22,8b	80	27	22,2
CV(%)	5,87	4,27	6,24	4,32	2,14			

AF = área foliar , NR = número de raízes, CMR = comprimento médio das raízes, MSPR= massa seca da parte radicular, MSPA = massa seca da parte aérea, S = sobrevivência (porcentagem), IAAF = índice de aumento de área foliar, IAMST = Índice de aumento da massa seca total (soma das partes aérea e radicular). *Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 5% pelo teste da D.M.S.

Plântulas inoculadas com *Burkholderia* sp. RzW32 apresentaram as menores massa seca da parte aérea, área foliar e conseqüente índice de aumento de área foliar (tabela 4). Bactérias deste gênero podem apresentar patogenicidade em orquídeas (KEITH et al., 2005). Estas características podem ter ocasionado um efeito deletério da bactéria em contato com a planta, redução de folhas e provocado as referidas respostas. O tratamento com *Curtobacterium* sp. RzW35 apresentou bom número de

raízes não acompanhado pelo comprimento radicular. Isto sugere que as plântulas apresentaram inibição para o crescimento em extensão ocasionado provavelmente pelo efeito negativo da inoculação repercutido também na sobrevivência.

Nas plântulas inoculadas com o isolado *Enterobacter* sp. EndW37 observou-se as maiores médias de área foliar, número e comprimento das raízes e massas secas. Tais características repercutiram também nos maiores índices de aumento (tabela 4). A área foliar é um parâmetro que reflete o crescimento significativo da planta, pois as folhas são órgãos que captam a energia luminosa do sol e a produção de matéria orgânica por meio do processo fotossintético. Plântulas inoculadas com este isolado apresentaram maior massa seca da parte aérea, a qual é representada pelo rizoma e folhas; comprovando a eficácia desta bactéria para o crescimento em expansão e acúmulo de biomassa.

Diversas *Enterobacter* spp. são rizobactérias endofíticas promotoras de crescimento. SHOEBITZ et al. (2008) isolaram *Enterobacter ludwigii* da gramínea chilena *Lolium perenne* e verificaram que trata-se de uma rizobactéria diazotrófica, solubilizadora de fósforo, produtora de AIA e com antagonismo *in vitro* com o fitopatógeno *Fusarium solani*, além de promover o crescimento radicular de sementes da planta hospedeira. SHENG et al. (2008a) identificaram o isolado *Enterobacter* sp. 12J1 capaz de colonizar e promover crescimento para milho, trigo e também biodegradar pireno, um hidrocarboneto aromático contaminante de solo. Os autores atestaram a utilidade adicional de RPCP para a biorremediação.

As auxinas são responsáveis pela indução de raízes adventícias bem como a extensão de todo sistema radicular. SORACE et al. (2007) mostraram que a pulverização semanal de auxina sintética em plântulas da orquídea paranaense *Oncidium baueri* causaram satisfatórios benefícios para o enraizamento e crescimento geral durante a aclimatização. Estes resultados apresentam claras evidências de que a inoculação de rizobactérias produtoras de AIA em plântulas germinadas em cultivo assimiótico podem auxiliá-las durante a fase *ex vitro*.

A partir da descoberta de Lewis Knudson em 1922 que as sementes de orquídeas germinam em um meio de cultura contendo sais minerais, ágar e sacarose e

a adição posterior de aminoácidos, vitaminas, reguladores de crescimento ou mesmo inclusão de outros sais (ARDITTI, 2008), a germinação assimbiótica se tornou um método estabelecido e conveniente para obtenção de plântulas da família Orchidaceae para fins comerciais ou conservacionistas (STEWART e KANE, 2006; STANCATO et al., 2008).

A despeito da rápida propagação e a obtenção de grande número de plântulas uniformes livres de patógenos proporcionado pela metodologia assimbiótica, a aclimatização de orquídeas propagadas *in vitro* é uma fase caracterizada pela alta mortalidade das plântulas ao se adaptarem as condições *ex vitro* (MELLO et al., 2002; WEBER et al., 2003), fator que contribui para a redução da quantidade produzida e consequente encarecimento da técnica.

Embora a germinação simbiótica com micorrizas determine as necessidades do cultivo assimbiótico de orquídeas (STEWART e KANE, 2006), o cultivo *in vitro* asséptico é preferido em decorrência da facilidade, simplicidade dos materiais envolvidos e amplo conhecimento dominado sobre o assunto (ARDITTI, 2008; STANCATO et al., 2008). Como consequência, a simbiose desta família vegetal com microrganismos (micorrizas ou mesmo rizobactérias) mantém-se pobremente compreendidos (NOGUEIRA et al., 2005). Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas para a utilização de rizobactérias durante a fase de aclimatização de plântulas de orquídeas, estágio considerado o gargalo para a micropropagação.

IV.4 Identificação dos isolados bacteriano

O método de extração do DNA de 24 isolados positivos para produção de AIA selecionados foi considerado adequado e gerou material genético com boa qualidade e rendimento (Figura 10B). Dentre os ácidos nucléicos obtidos, foram selecionadas as amostras com fragmentos com tamanho molecular acima de 10 Kb com relação 260/280 nm de 1,8 a 2,0.

O perfil eletroforético da reação em cadeia da polimerase dos isolados selecionados para a identificação estão na figura 11.

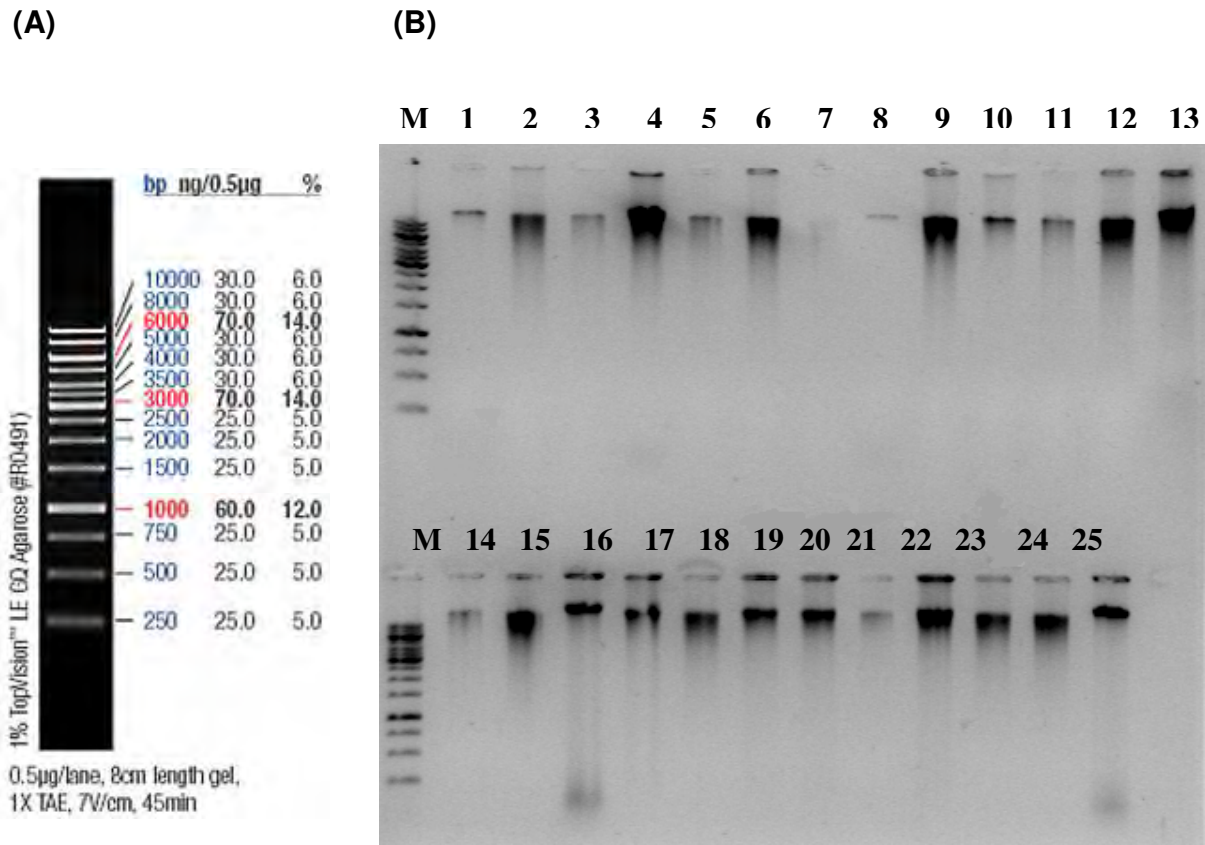


FIGURA 10: (A) Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular (padrão) 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda. (B) Perfil eletroforético do DNA genômico extraído de 23 isolados bacterianos por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Canaletas **M** – 1 Kb DNA “ladder”, Fermentas (padrão); **2** – RzP53; **3** - SIC8; **4** – SIC16; **5** – SIC18; **6** – SIC29; **8** – SIC46; **9** – RzV25; **10** – RzV26; **11** – EndV39; **12** – EndV40; **13** – RzW31; **14** – RzW32; **15** – RzW35; **16** – EndW37; **17** – EndW48; **18** – EndW57; **19** – EndW60; **20** – Rzl64; **21** – Rzl66; **22** – EndI69; **23** – SIO73; **24** – Rzo79; **25** – EndO81.

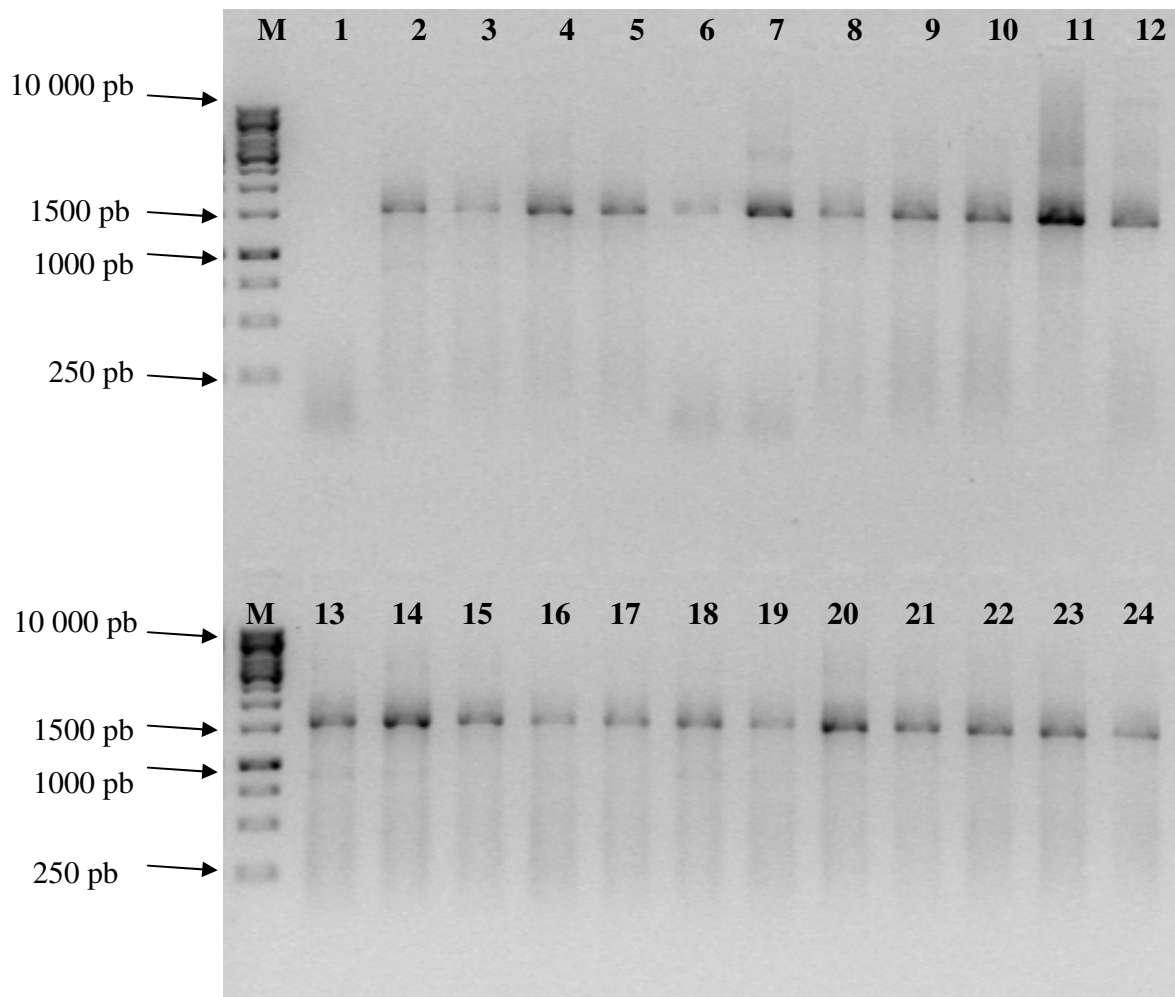


FIGURA 11: Perfil eletroforético da reação padrão de amplificação do gene 16S rRNA. **M** – marcador. **1** – Controle negativo, **2** – SIC4; **3** – SIC6; **4** – SIC16; **5** – SIC18; **6** – SIC29; **8** – SIC46; **9** – RzV26; **10** – EndV38; **11** – EndV39; **12** – EndV40; **13** – RzW31; **14** – RzW32; **15** – RzW35; **16** – EndW37; **17** – EndW48; **18** – EndW57; **19** – EndW60; **20** – Rzl66; **21** – EndI69; **22** – SIO73; **23** – SIO84; **24** – EndO81.

Depois de amplificados, os produtos de PCR foram seqüenciados e as sequências analisadas submetidas ao blast. Os isolados com o gene 16S rRNA sequenciados e sua respectiva homologia com sequências do GenBank estão listados na tabela 5.

TABELA 5: Identificação de isolados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA

Código Isolado	Comprimento do gene sequenciado	Organismo homólogo			
		Espécie	e- value	Acesso Nº	% id.
SIC4	471 pb	<i>Bacillus</i> sp.	0	AJ489383	96%
SIC6	511 pb	<i>Enterobacter</i> sp.	0	AB291629	99%
SIC15	437 pb	<i>Bacillus</i> sp.	0	AM697415	97%
SIC16	545 pb	<i>Rhizobium</i> sp.	0	FJ025120	99%
SIC18	671 pb	<i>Rhizobium</i> sp.	0	FJ025120	98%
SIC29	430 pb	<i>Rhizobium</i> sp.	0	EU705124	98%
SIC43	444 pb	<i>Bacillus</i> sp.	0	EU982900	100%
SIC45	487 pb	<i>Enterobacter</i> sp.	0	AM403125	98%
SIC46	494 pb	<i>Rhizobium</i> sp.	0	EU488752	99%
RzW31	530 pb	<i>Bacillus</i> sp.	0	FJ174643	100%
RzW32	463 pb	<i>Burkholderia</i> sp.	0	AF247496	97%
RzW35	456 pb	<i>Curtobacterium</i> sp.	0	EU741030	98%
EndW37	523 pb	<i>Enterobacter</i> sp.	0	FJ664513	98%
EndW48	419 pb	<i>Bacillus</i> sp.	0	FJ664514	99%
EndW57	565 pb	<i>Curtobacterium</i> sp.	1e ⁻⁶	EU740993	96%

Continua na próxima página

Código Isolado	Comprimento do gene sequenciado	Organismo homólogo			
		Espécie	e- value	Acesso Nº	% id.
EndW60	413 pb	<i>Bacillus</i> sp	0	EU795037	98%
EndV26	406 pb	<i>Enterobacter</i> sp.	0	EU554444	99%
EndV38	427 pb	<i>Burkholderia</i> sp.	0	DQ118949	95%
EndV39	424 pb	<i>Pantoea</i> sp.	0	AF130971	96%
EndV40	430 pb	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	EF157292	97%
RzI66	459 pb	<i>Burkholderia</i> sp.	1e ⁻⁶	AB299578	95%
EndI69	510 pb	<i>Achromobacter</i> sp.	0	FJ810080	96%
SIO73	463 pb	<i>Methylophilus</i> sp.	0	EU194877	96%
EndO81	560 pb	<i>Bacillus</i> sp.	0	EU754025	97%
SIO84	490 pb	<i>Pantoea</i> sp.	0	FJ811867	95%
RzP53	417 pb	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	DQ854817	95%

As famílias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Burkholderiaceae, Bacillaceae e Rhizobiaceae são bem conhecidas como bactérias associadas com plantas (PARK et al., 2005; TSAVKELOVA et al., 2007a; AHMAD et al., 2008; SOLANO et al., 2008;). Constatou-se que o grupo Proteobactéria prevaleceu nas comunidades bacterianas associadas às orquídeas estudadas.

A ocorrência de *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Curtobacterium* spp. *Pantoea* spp. e *Pseudomonas* spp. na rizosfera e como endossimbiontes em orquídeas terrestres e epífitas foram relatadas em outros estudos (WILKINSON et al., 1989 e 1994; TSAVKELOVA et al., 2005 e 2007a).

Bactérias que compõe o gênero *Bacillus* são amplamente distribuídas no solo (ROSCH et al., 2002; GARBEVA et al., 2003). Numerosas linhagens deste grupo expressam atividades promotoras de crescimento e diversas delas têm sido desenvolvidas comercialmente como fungicidas biológicos, inseticidas, nematicidas,

indutores de resistência sistêmica ou genéricos promotores de crescimento de plantas (KLOEPPER et al., 2004; BENEDUZI et al., 2008). Ainda, uma linhagem de *Bacillus pumillus* e sua metodologia de inoculação foram patenteadas por oferecer significativo estímulo para a germinação e crescimento de orquídeas (Patente da Federação Russa N°. 2272409, citado por TSAVKELOVA et al., 2007a).

Este gênero bacteriano vem sendo relatado na literatura por apresentar ampla plasticidade e benefícios ambientais, tais como a produção de biossurfactantes, tolerância a solos contaminados com Cádmiio e promoção de crescimento de plântulas de canola e tomate (GHOSH et al., 2003; SHENG et al., 2008b; HE et al., 2009).

Os isolados selecionados neste trabalho poderão ser empregados em futuros testes com outras culturas. Uma série de trabalhos relata a capacidade benéfica que alguns organismos apresentam ao ser inoculados em outras plantas (de espécies as quais não foram isolados), e propõe não haver certa especificidade bactéria-hospedeiro em alguns casos (MELLO et al., 2002; SANTOS et al., 2005).

V. CONCLUSÕES

1 – Entre os organismos que habitam a rizosfera das seis orquídeas investigadas neste estudo, a maior quantidade foi isolada da terrestre *Cyrtopodium paludicolum*;

2 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência detectou compostos indólicos produzidos na cultura líquida dos isolados e apresentou menores quantidades de auxinas que a quantificação colorimétrica;

3 – Dentre as rizobactérias produtoras de AIA que habitam o velame de *Cattleya walkeriana*, dois isolados (*Enterobacter* sp. e *Bacillus* sp.) mostraram-se promissores para a promoção de crescimento desta espécie orquídea durante a fase *ex vitro* de plântulas obtidas de maneira assimbiótica, enquanto os isolados *Burkholderia* sp. e *Curtobacteria* sp. não foram eficientes para a sobrevivência e promoção de crescimento durante a aclimatização das plântulas;

4 – Nenhum dos quatro isolados rizobacterianos investigados (*Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Curtobacteria* sp. e *Enterobacter* sp.) promoveu a germinação *in vitro* de sementes da orquídea *Cattleya walkeriana*, pois provocou a contaminação do meio de cultura.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizosferic bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Jena, v.163, n.2, p.173-181, 2008.

ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 691p.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 682p.

ARDITTI, J. **Micropropagation of orchids**. 2^a ed. New York: Wiley-Blackwell, 2008. 1560p.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, p.231-237, 2002.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodeversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamim/Cummings Science, 1998. p.27-57.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, v.1. New York: John Wiley & Sons, 1987.

AVIS, T. J.; GRAVEL V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.40, n.7, p.1733–1740, 2008.

AYYADURAI N.; NAIK, P.R.; RAO, M.S.; KUMAR R.K.; SAMRAT, S.K.; MANOHAR, M.; SAKTHIVEL, N. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.100, n.4, p.926–937, 2006.

BAIS, H.P.; PARK, S.W.; WEIR, T.L.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.9, n.1, p.26-32, 2004.

BALDANI JI, CARUSO L, BALDANI VLD, GOI SR, DÖBEREINER J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.911–922, 1997.

BARRETO, D. W.; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.64, n.2, p.287–291, 2006.

BATISTA, J.A.N.; BIANCHETTI, L.B. Three new taxa in *Cyrtopodium* (ORCHIDACEAE) from central and southeastern Brazil. **Brittonia**, New York, v. 56, n.3, p.260-274, 2004.

BATISTA, J.A.N.; BIANCHETTI, L.B. Two new taxa in *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from southern Brazil. **Darwiniana**, Buenos Aires, v.43, p.74-83, 2005.

BATISTA, J.A.N.; BIANCHETTI, L.B.; PELLIZZARO, K.F. Orchidaceae da Reserva Ecológica do Guarará, DF, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.19, p.221-232, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa de setembro de 2008. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/e/a32>>. Acesso em: 20 de set. 2008.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L.K.; BODANESE-ZANETTINI M.H.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.3, n.3, p.311-320, 2008.

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**, Montrouge, v.45, n.1, p.12–19, 2009a.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v.45, n.1, p.28–35, 2009b.

CATTELAN, A.J.; GRASSANO, A. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculante, estirpes e outras tecnologias relacionadas a bactérias promotoras do crescimento vegetal. In.: CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola (RELARE)**. Londrina, PR: EMBRAPA-CNPSO, 2007, p.154-173. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 290)

CHEN, C. *In situ* measurement of microclimate for the plantlets cultured *in vitro*. **Biosystems Engineering**, London, v.95, n.3, p.413–423, 2006.

CHEN, Y.; LIU, Y.; JIANG, J.; ZHANG, Y.; YIN, B. Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*. **Food Chemistry**, London, v.111, n.1, p.11–12, 2008.

COLOMBO, L.A.; FARIA, R.T.; ASSIS, A.M.; FONSECA, I.C.B. Aclimatização de um híbrido de *Cattleya* em substratos de origem vegetal sob dois sistemas de irrigação. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.27, n.1, p.145-150, 2005.

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

COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchids diversity: an evolutionary consequence of deception? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.20, n.9, p.487–494, 2005.

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

DEMASON, D.A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**, Berlin, v.32, p.1432-2048, 2005.

DIVAKARAN, M.; BABU, K.N.; PETER, K.V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v.110, n.2, p.175-180, 2006.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family**. Hong Kong: Dioscorides Press, 1993.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.28, p.377–381, 1999.

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

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

FAN, C.; WANG, W.; WANG, Y.; QIN, G.; ZHAO, W. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. **Phytochemistry**, New York, v.57, p.1255–1258, 2001.

FARIA, R.T.; REGO, R.V.; BERNARDI, A.; MOLINARI, H. Performance of different genotypes of brazilian orchid cultivation in alternative substrates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.44, n.4, p.337-342, 2001.

GALDIANO JR., R.F. **Efeito da suplementação de meio de cultura com aditivos orgânicos para o crescimento *in vitro* e morfogênese de *Cattleya walkeriana* Gardner (ORCHIDACEAE)**. 2006, 60f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, SP, 2006.

GAO, M.; LI, R.; DAI, S.; WU, Y.; YI, D. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. **Biological Control**, Orlando, v.44, n.3, p.380–388, 2008.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. **Microbial Ecology**, New York, v.45, n.2, p.302–316. 2003.

GHOSH S.; PENTERMAN, J.N.; LITTLE, R.D.; CHAVEZ R.; GLICK, B.R. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica*

campestris. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.41, n.3, p.277–281, 2003.

GLICK, B.R.; KARATUROVIC, D.M.; NEWELL, P.C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting pseudomonads. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.533-536, 1995

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. **Plant Physiology**, Washington, v.26, n.3, p.192-197, 1951.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, v. 8, n.3, p.195-202, 1998.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDEL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.8, p.1968–1977, 2007.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; NATARAJAN, M.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of bacteriology**, Washington, v.183, n.8, p.2634-2645, 2001.

HADLEY, G.; HARVAIS, G. The effect of certain growth substances on assymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. **New Phytologist**, Cambridge, v.67, n.2, p.441-445, 1968.

HALLMANN, J.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to

nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.31, n.2, p.551-560, 1999.

HE, L.Y.; CHEN, Z.J.; REN, G.D.; ZHANG, Y.F.; QIAN, M.; SHENG, X.F. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, 2009, doi:10.1016/j.ecoenv.2009.03.006 (in press).

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

JENSEN, J.B.; EGSGAARD, H.; ONCKELEN, H.V.; JOCHIMSEN, B.U. Catabolism of Indole-3-Acetic Acid and 4- and 5-Chloroindole-3-Acetic Acid in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, n.20, p.5762–5766, 1995.

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.V.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; AZAROVA, T.; AKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v.19, n.2, p.250–256, 2006.

KEITH, L.M.; SEWAKE, K.T.; ZEE, F.T. Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from orchids in Hawaii. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, p.1273-1278, 2005.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 452p.

KLOEPPER, J.W. RYU; C.M.; ZHANG, S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, p.1259-1266, 2004.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v.15, p.214-217, 1946.

KRAVCHENKO, L., AZAROVA, T., MAKAROVA, N., TIKHONOVICH, I. The effect of tryptophan of plant root metabolites on the phytostimulating activity of rhizobacteria. **Microbiology**, Moscow, v.73, n.1, p.195–198, 2004.

LI, J.H.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.40, n.1, p.238–246, 2008.

MAHENDRAN, G.; BAI, V.N. Mass propagation of *Satyrium nepalense* D.Don.—A medicinal orchid via seed culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.119, p.203–207, 2009.

MALONEK S, BOMKE C, BORNBERG-BAUER E, ROJAS MC, HEDDEN P, HOPKINS P, TUDZYNSKI B. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Phytochemistry**. New York, v.66, p.1296-1311, 2005.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, New York, v.51, n.3, p.326-335, 2006.

MELLO, M.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v.38, n.3, p.50-60, 2002.

MENEZES, L. C. *Ionopsis utricularioides* var. *virginalis* L.C. Men. Var. nov. **Boletim da Coordenadoria das Associações Orquidófilas do Brasil (CAOB)**, São José do Rio Preto, v.3, n.3, p.21-22, 1990.

MENEZES, L. C. **Genus** *Cyrtopodium*: espécies brasileiras. Brasília: IBAMA, 2000. 208p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

MUTHUKURAMASAMY, R.; KANG, U.G.; PARK, K.D.; JEON, W.T.; PARK, C.Y.; CHO, Y.S.; KWON, S.W.; SONG, J.; ROH, D.H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.102, n.4, p.981-991, 2007

NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.5, p.1-20, 1996.

NOGUEIRA, R.E.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, C.M.; LANNA, M.C.S.; MENDONÇA, M.P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v.19, p.417-424, 2005.

NOWAK, J.; ASIEDU, S.K.; BENSALIM, S.; RICHARDS, J.; STEWART, A.; SMITH, C.; STEVENS, D. STURZ, A.V. From laboratory to applications: challenges and progress

with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.52, p.97–103, 1998.

OTERO, J.T.; ACKERMAN, J.D.; BAYMAN, P. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. **Molecular Ecology**, Oxford, v.13, p. 2393-2404, 2004.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae brasiliensis**, 1975, v.1, 408p.

PARK, M., KIM, C., YANG, J., LEE, H., SHIN, W., KIM, S., SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiology Research**, Jena, v.160, n.2, p.127–133, 2005.

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

PEREIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.; CARARETO-ALVES, R.M.; LEMOS, E.G.M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.32, p.1921-1927, 2008.

PÉREZ, E.; SULBARAN, M.; BALL, M.; YARZABAL, L.A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.11, p.2905-2914, 2007.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; AS, T. *Quorum-sensing* signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under *in vitro* and *in planta* conditions. **Research in Microbiology**, Paris, v.158, p.287-294, 2007.

RAJKUMAR, M; FREITAS, H. Effects of inoculation of plant growth promoting bacteria on Ni uptake by Indian mustard. **Bioresource Technology**, Essex, v.99, n.9, p.3491–3498, 2008.

RASMUSSEN, H.N. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. **Plant and Soil**, The Hague, v.244, p.149–163, 2002.

ROBERTS, D.L.; DIXON, K.W. Orchids. **Current Biology**, London, v.18, n.8, p.325-329, 2008.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; RODELAS-GONZALÉS, B.; POZO-CLEMENTE, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. A Review on the Taxonomy and Possible Screening Traits of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions** - strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2008, p.55-80.

ROSCH, C., MERGEL, A., BOTHE, H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.8, p.3818–3829, 2002.

SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R.L.R. CAMARA, T. R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v.32, n.2, p.1-8, 2005.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Resolução SMA 48, de 21 de setembro de 2004. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/legislacao/estadual/resolucoes/2004_Res_SMA_48.pdf. Acesso em: 30 de abr. 2009.

SHEEHAN, T.; SHEEHAN, M. **An illustrated survey of orchid genera**. Portland: Timber Press, 1994. p.288-293.

SHENG, X.; CHEN, X.; HE, L. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.62, n.2, p.88–95, 2008a.

SHENG, X.; HE, L.; WANG, Q.; YE, H.; JIANG, J. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.155, n. 1, p.17–22, 2008b.

SHOEBITZ, M.; RIBAUDO, C.M.; PARDO M.A.; CANTORE, M.L.; CIAMPI L.; CURA, J.A. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere, **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, 2008, doi:10.1016/j.soilbio.2007.12.031. (in press).

SILVA, C.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae) **Acta Scientiarum**, Maringá, v.26, n.1, p.91-100, 2004.

SOLANO, B.R., BARRIUSO, J. GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions** - strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2008, p.41-54.

SORACE, M.; FARIA, R.T.; YAMAMOTO, L.Y.; SCHNITZER, J.A.; L.S. TAKAHASHI, A. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, p.195-200, 2007.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; MORA, R.R.; SWINGS, J.; TRUPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A.C.; WHITMAN, W.B. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.52, p.1043–1047, 2002.

STANCATO, G.C.; ABREU, M.F.; FURLANI, A.M.C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. **Bragantia**, Campinas, v.67, p.51-57, 2008.

STEWART, S.L.; ZETTLER, L.W.; MINSO, J.; BROWN, P.M. Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. **Selbyana**, Sarasota, v.24, p.64–70, 2003.

STEWART, S.L.; KANE, M.E. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.86, p.147–158, 2006.

STOESSL, A.; ARDITTI, J. Orchid phytoalexins. In: ARDITTI, J. (Ed.), **Orchid Biology: reviews and perspectives**. New York: Cornell University Press, 1984. p. 151–175.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3^a Ed. Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2004. p.454-460.

TAKANE, R.J.; YANAGISAWA, S.S. **Cultivo moderno de orquídeas: Phalaenopsis**. São Paulo: Ed. Cantareira, 2007. 130p.

TANIMOTO, E. Regulation of root growth by plant hormones — roles for auxin and gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v.24, p.249–265, 2005

TIEN, T., GASKINS, M., HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.5, p.1016–1024, 1979.

TILAK, K.V.B.R.; RANGANAYAKI, N.; PAL K.K.R.; SAXENA, A. K.; NAUTIYAL, C.S.; MITTAL, S.; TRIPATHI, A.K.; JOHRI, B.N. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. **Current Science**, Bangalore, v.89, n.1, p.136-150, 2005.

THOMAS, P. Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p.114–123, 2004.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNSTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Microbiology**, Moscow, v.74, n.1, p.46-53, 2005.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.42, n.2, p.117–126, 2006.

TSAVKELOVA, E. A., CHERDYNSTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Jena, v. 162, n.1, p. 69-76, 2007a.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; KLIMOVA, S.Y.; SHESTAKOV, A.I.; BOTINA, S.G.; NETRUSOV, A.I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.188, p.655–664, 2007b.

VESSEY, J.K. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v.255, p.571-586, 2003.

WEBER, O.B.; CORREIA, D.; ROCHA, M.W.; ALVEZ, G.C.; OLIVEIRA, E.M.; SÁ, E.G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.1419-1426, 2003.

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

WENZEL, C. A. S. Diferenças entre *Cattleya walkeriana* Gardner e *Cattleya nobilior* RCHB.f. e suas respectivas distribuições geográficas. **Boletim da Coordenadoria das Associações Orquidófilas do Brasil (CAOB)**, São José do Rio Preto, v.2, n.4, p.21-27, 1990.

WILKINSON, K.G.; DIXON, K.W.; SIVASITHAMPARAM, K. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. **New Phytologist**, Cambridge, v.112, n.3, p.429-435, 1989.

WILKINSON, K., DIXON, K.W., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v.159, p.291–295, 1994a.

WILKINSON, K.G.; SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.W.; FAHY, P. C.; BRADLEY, J.K. Identification and characterization of bacteria associated with Western Australian orchids. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.26, n.1, p.137-142, 1994b.

ZHUANG, X.; CHEN, J.; SHIM, H.; BAI, Z. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environment International**, New York, v.33, p.406–413, 2007.