

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MILHO
(*Zea mays L.*)**

Msc. Eliamar Aparecida Nascimbém Pedrinho
Biomédica

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Fevereiro de 2009**

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

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MILHO
(*Zea mays L.*)**

Msc. Eliamar Aparecida Nascimbém Pedrinho

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

JABOTICABAL, SP – BRASIL

Fevereiro de 2009

P371i Pedrinho, Eliamar Aparecida Nascimb'em
Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de
crescimento em milho (*Zea mays*). /Eliamar Aparecida Nascimbem
Pedrinho. – – Jaboticabal, 2009
x, 74 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Banca examinadora: Lucia Maria Carareto Alves, Cristina Lacerda
Soares Petrarolha Silva, Jackson Antonio Marcondes, Rodrigo
Matheus Pereira
Bibliografia

1. PGPRs. 2. acido indol-acetico. 3. solubilizacao de fosfato. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.5:633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Eliamar Aparecida Nascimbém Pedrinho – Nascida aos 04 de Janeiro de 1977, no município de Jaboticabal, Estado de São Paulo. Bacharel em Biomedicina pelo Centro Universitário Barão de Mauá, no ano de 2000. Mestre em Microbiologia Agropcuária pela UNESP - FCAV, Jaboticabal –SP em dezembro de 2004.

Nessa mesma Universidade, ingressou em Novembro de 2005, no curso de Doutorado.

“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

Aos meus pais

Aimar e Eliana

Os quais me mostram a importância da união familiar , o perdão...

Por darem amor, apoio, estudo e compreensão,

Pela educação, lições de vida e moral

À meu irmão Aimar Jr e minha cunhada Graciana

Pelo carinho, amizade, amor e conselhos

À minha querida eterna avó Elisa (*In memoriam*)

Por fazer parte da história de minha vida.....saudades!!!!

Ao meu marido Fábio

Pelo amor e grande compreensão para realização deste trabalho.

Ao meu maior presente, um pedaço de mim....

Matheus, meu filho amado.

.....e principalmente à Deus que me possibilitou a tudo isso.....

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, a quem muito admiro pela competência profissional e genialidade. Agradeço pela orientação e oportunidade de crescimento pessoal e profissional

A Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, com quem muito aprendi, pela co-orientação, amizade e oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores Dr. Jaime Maia dos Santos, Dra. Janete Desidério Senna, Dr. João Pizauro e Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pelas sugestões no Exame de Qualificação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus amigos do LBMP pelo carinho, amizade e compreensão.

Aos meus amigos da equipe RPCP que me ajudaram na finalização deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Tecnologia pelo Carinho e amizade.

Aos meus pais Aimar e Eliana por me darem a oportunidade de um diploma...

Ao meu marido Fábio pela ajuda, carinho e compreensão para finalizar este trabalho e ao meu filho Matheus, obrigada por existirem!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
I.INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
II.1 A cultura do milho.....	3
II.2 Bactérias diazotróficas.....	5
II.3 Solubilização de fosfato.....	11
II.4 Fitohormônios.....	13
II.4.1 Auxinas.....	16
II.5 A importância do nitrogênio.....	17
II.6 Bactérias fixadoras de nitrogênio.....	19
II.7 Contribuição de FBN na cultura do milho.....	21
II.8 A importância de técnicas moleculares na identificação e diversidade de bactérias promotoras de crescimento.....	23
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
III.1 Fluxograma experimental.....	24
III.2 Isolamento das estirpes selvagens em plantas de milho.....	25
III.3 Extração do DNA genômico e identificação dos isolados pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA.....	26
III.4 Seqüenciamento do gene 16S rRNA.....	26
III.5 Análise das seqüências.....	27
III.6 Determinação colorimétrica da AIA.....	28
III.7 Solubilização de fosfato.....	29
III.8 Atividade enzimática da nitrogenase via redução de acetileno.....	29
III.9 Avaliação do desenvolvimento das plantas de milho inoculadas em casa de vegetação.....	30

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
IV.1 Coleta, isolamento e identificação dos isolados.....	31
IV.2 Avaliação da produção de AIA pelos isolados.....	38
IV.3 Avaliação da solubilização de fosfato pelos isolados.....	42
IV.4 Avaliação do isolado R4.1 como RPCP em plântulas de milho.....	47
IV.5 Atividade da redução de acetileno a etileno “ <i>in vitro</i> ”.....	48
IV.6 Avaliação do acúmulo de nitrogênio por diferentes isolados em casa de vegetação.....	51
V. CONCLUSÃO.....	54
VI. REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE I.....	72
APÊNDICE II.....	72

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Resultados da quantidade de isolados obtidos pelo uso dos diferentes meios de cultura da rizosfera de plantas de milho, híbrido Impacto.....	32
TABELA 2: Identificação dos isolados pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	33
TABELA 3: Dosagens colorimétrica do AIA em diferentes estágios de cultivo em meio DYGS suplementado com 100 µg/mL de triptofano em DO ₆₀₀ , aproximada de 0,8 (12-24 hs de crescimento), 1,5 (24-48 hs de crescimento) e ≥3,5 (48-72 hs de crescimento)...	39
TABELA 4: Teste de solubilização de fosfato em meio NBRIP. Halos avaliados com 12, 48 horas de crescimento e 15 dias.....	43
TABELA 5: Classificação taxonômica dos isolados capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato.....	46
TABELA 6: Média dos valores da massa da parte aérea e radicular e altura de plantas de milho, inoculadas com diferentes bactérias na avaliação como PGPRs.....	47
TABELA 7: Atividade de redução de acetileno ARA dos isolados positivos para AIA e solubilizadores de fosfato.....	51

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Perfil eletroforético da extração de alguns DNAs dos isolados selvagens obtidos de raízes de milho, híbrido Impacto, em gel de agarose 1,5% contendo Brometo de etídeo (0,5mg/μl).....**36**
- FIGURA 2:** Perfil eletroforético de fragmentos de DNA gerados pela amplificação do DNA dos isolados bacterianos de raízes de milho, híbrido Impacto, pelo uso do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores Fd1/Rd1 em gel de Agarose 1% contendo Brometo de etídeo(0,5mg/μl).....**36**
- FIGURA 3:** Teste colorimétrico da produção de AIA em meio DYGS suplementado com 100 uL/mL de triptofano realizado com reagente de Salkowsky.....**38**
- FIGURA 4:** Diversidade de produção de halos de solubilização de fosfato observados em meio sólido (NBRIP) pelos isolados de rizosféricos de milho, após 15 dias de cultivo.....**44**

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MILHO (*Zea mays* L.)

RESUMO - Estudos sobre a atividade microbiológica que ocorre na rizosfera de diversos vegetais levaram ao descobrimento de grupos de microrganismos importantes para o desenvolvimento vegetal. Dentre eles estão as rizobactérias que são capazes de colonizar as raízes, estimulando-a diretamente ou beneficiando o crescimento e o desenvolvimento de diversas plantas, essas bactérias são chamadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas ou RPCP. Este trabalho teve o objetivo de isolar, identificar, testar a capacidade da solubilização de fosfato, produção de ácido indol- acético (AIA) e fixação de nitrogênio de alguns isolados obtidos de quatro regiões diferentes do Brasil, assim como o efeito da inoculação destes em sementes de milho (híbrido Imapcto) testados na casa de vegetação. As metodologias utilizadas neste trabalho propiciaram a seleção de isolados que se destacaram positivamente. A análise parcial do gene 16S rRNA dos 87 isolados possibilitou a identificação dos gêneros, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Azospirillum*, sendo os mais freqüentes totalizando 78% dos isolados, seguidos de *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Pantoea* e *Bosea*. Desses, 42 foram positivos no teste colorimétrico para detecção de produção do AIA e somente 24 apresentaram a capacidade de solubilização do fosfato. A partir destes resultados selecionou-se um organismo pertencente ao gênero *Sphingomonas* para ser testado em casa de vegetação como promotor de crescimento em conjunto com as estirpes de *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6). As plantas foram avaliadas quanto à altura, aos vinte e setenta dias após a germinação, e a massa seca da parte aérea e radicular foram quantificadas após setenta dias, no encerramento do experimento. Já a capacidade de redução do acetileno a etileno *in vitro* foi positiva somente para quatro organismos pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas* e *Herbaspirillum* em meio NFb. Com estes isolados testou-se a capacidade em fixar nitrogênio avaliando o desenvolvimento das plântulas de milho em casa de vegetação por trinta dias, com as estirpes de *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6). A avaliação foi realizada quanto à altura, peso da massa seca (parte aérea e radicular) e dosagem do acúmulo de nitrogênio total na parte aérea, encerrando o experimento. Análises estatísticas realizadas pelo programa Statistix v.9.0 indicaram que o isolado pertencente ao gênero *Sphingomonas* apresentou resultados semelhantes às estirpes AbV5 e AbV6 nas plântulas de milho, podendo este tornar-se um microrganismo promissor para ser utilizado como RPCP. Para os isolados testados como fixadores de N não houve resultado significativo em comparação as estirpes AbV5 e AbV6 e ao controle negativo.

Palavras chaves: PGPRs, ácido indol acético, solubilização de fosfato, diazotróficos.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTER BACTERIA IN MAIZE (*Zea mays* L.)

SUMMARY - Studies on the microbial activity that occurs in the rhizosphere of different plants have led to the discovery of groups of important microorganisms to plant development. Among them are the rhizobacteria that are able to colonize the roots, stimulating it directly or benefiting the growth and development of many plants, these bacteria are called Plant Growth Promotion Rhizobacteria in plants or RPCP. This study aimed to isolate, identify, test the ability of phosphate solubilization, production of indole-acetic acid (IAA) and nitrogen fixation of some isolates from four different regions of Brazil, as well as the effect of inoculation in these maize seeds (hybrid Imapcto) tested in the greenhouse. The methods used in this study enabled the selection of isolates that stood out positively. The analysis of partial 16S rRNA gene of the 87 isolates allowed the identification of genera, *Bacillus*, *Azospirillum* and *Burkholderia*, with the most frequent totaling 78% of isolates, followed by *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Pantoea* and *Bosea*. Of these, 42 were positive in the colorimetric test for detection of production of the EIA and only 24 had the capacity of phosphate solubilization. From these results picked up a body belonging to the genus *Sphingomonas* to be tested in the greenhouse as promoter of growth together with the strains of *Azospirillum brasilense* (AbV5 and AbV6). The plants were then evaluated for the twenty and seventy days after germination and dry weight of shoot and root were quantified after seventy days, at the end of the experiment. The capacity of reduction of acetylene to ethylene in vitro were positive for only four bodies belonging to the genera *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas* and *Herbaspirillum* amid NFb. With these isolates tested was the ability to fix nitrogen evaluating the development of maize seedlings in a greenhouse for thirty days, with the strains of *Azospirillum brasilense* (AbV5 and AbV6). The evaluation was performed on the height, weight of dry matter (shoot and root) and estimation of accumulation of total nitrogen in the air, ending the experiment. Statistical analysis performed by the program Statistix v.9.0 indicated that the isolate belonging to the genus *Sphingomonas* strains showed similar results to AbV5 and AbV6 in seedlings of maize, this may become a promising microorganism for use as RPCP. For the isolates of N fixation as there was no significant result in comparison to strains AbV5 and AbV6 and the negative control.

Keywords: PGPR, indole- acetic acid, phosphate solubilization, diazotrophics

I. INTRODUÇÃO:

O milho (*Zea mays*) é a mais importante planta comercial com origem nas Américas. Há indicações de que sua origem tenha sido no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos e constitui-se na principal fonte de calorias para milhões de pessoas.

Os gastos com fertilizantes nitrogenados nessa cultura provocam um alto custo de produção para o agricultor, os quais repassados ao consumidor. Desta forma, existe a necessidade de avanços nas pesquisas sobre microrganismos que se encontram na rizosfera de diversos vegetais e que auxiliam os mesmos na obtenção de nutrientes, diminuindo o custo e aumentando a produção.

As Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) representam uma grande variedade de bactérias de solo que, quando associadas com plantas, levam a um aumento substancial da área da raiz. Esse aumento na superfície radicular promove uma maior eficiência na retirada de água, macro e micro nutrientes pelas plantas. Outro aspecto importante é que as RPCPs apresentam um relativo efeito antagônico sobre muitos microrganismos patogênicos, promovendo, portanto, um eficiente controle biológico na natureza.

A utilização dos microrganismos na forma de inoculantes biológicos pode ajudar o mercado agrícola, pois é uma das tecnologias mais eficientes em substituir métodos tradicionais de adubação com fertilizantes a base de uréia, e atualmente é utilizado principalmente em culturas de leguminosas. Inoculantes nacionais direcionados a cultura do milho não estão ainda disponíveis no mercado brasileiro, em função do processo de fixação biológica de nitrogênio não ser tão eficiente como ocorre para as leguminosas. Isto, existem resultados controversos relacionados à baixa sobrevivência dos microrganismos no solo e à necessidade de re-inoculação das plantas após a germinação.

O Brasil é um dos países pioneiros em utilização de bactérias diazotróficas como produtos comerciais compostos por bactérias do solo chamadas rizóbios que formam estruturas especializadas nas raízes das plantas para a redução e o repasse do

nitrogênio em uma forma assimilável para as leguminosas. Entretanto, estudos apontam que alguns destes microrganismos, tais como *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium etli*, têm habilidade de colonizar as raízes de plantas não leguminosas, sugerindo outro mecanismo de estimulação para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Devido aos avanços nas pesquisas sobre novos microrganismos que possam ser utilizados futuramente como produtos agrícolas, em gramíneas, a biotecnologia ganhou um novo aliado para diversidade e classificações microbianas dos solos através metodologias moleculares, pois as técnicas tradicionais não suprem as necessidades de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico.

Diante do exposto, o potencial de uso de bactérias diazotróficas como alternativa para a nutrição nitrogenada em diversas culturas de poáceas (antiga família das gramíneas), de importância econômica, pode ter forte impacto em culturas como milho. Isto se dá não apenas ao que se refere ao volume de produção e tamanho de área plantada, mas também por sua importância sócio-econômica.

Assim, este trabalho objetivou-se em isolar, identificar, testar a capacidade da solubilização de fosfato, produção de ácido indol-acético (AIA) e fixação de nitrogênio, medida pela redução acetileno *in vitro*, e conseqüentemente observando o efeito da inoculação destas em sementes de milho (híbrido Imapcto) em casa de vegetação.

O objetivo geral desse estudo foi isolar e identificar bactérias diazotróficas com ação potencial sobre o crescimento de plantas de milho (*Zea mays*).

Assim tem-se por objetivos específicos, com base em análises bioquímicas, moleculares e agronômicas:

- Amostrar e isolar a microbiota da rizosfera de milho cultivado em 4 diferentes localidades brasileiras.
- Caracterizar e identificar molecularmente as bactérias diazotróficas isoladas.
- Testar a capacidade de solubilização de fosfato, produção de AIA e fixação de nitrogênio nas bactérias isoladas.
- Avaliar sob condição de casa de vegetação o efeito da inoculação das bactérias diazotróficas isoladas, sobre o desenvolvimento de plantas de

milho.

II. REVISÃO DE LITERATURA:

II.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais antigas do mundo, havendo indicações, através de escavações arqueológicas e geológicas, e de medições por desintegração radioativa, de que é cultivado há pelo menos 6000 anos (PIPERNO & FLANNERY, 2001). Logo depois do descobrimento da América Central e do Norte, o milho foi levado para a Europa, onde era cultivado em jardins, até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Passou, então, a ser plantado em escala comercial e difundiu-se por todos os continentes (FAGERIA, 1989; NORMAN et al., 1995; TOLLENAAR & DWYER, 1999).

Na evolução mundial de produção de milho, o Brasil tem destaque como terceiro maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos e pela China. No ano agrícola de 2005/06 a produção mundial ficou em torno de 684 milhões de toneladas, tendo sido produzido 282 milhões de toneladas pelos Estados Unidos, 134 milhões pela China e 43 milhões pelo Brasil (USDA, 2006). Apesar de estar entre os três maiores produtores, o Brasil não se destaca entre os países com maior produtividade. Considerando que a produtividade média mundial está pouco acima de quatro toneladas por hectare, nota-se que o Brasil está abaixo desta média. Porém, a produtividade brasileira tem crescido sistematicamente, passando de 1870 kg ha⁻¹ em 1990, para 3785 kg ha⁻¹ em 2007 (IBGE, 2008).

No cenário nacional, o milho é o segundo grão mais importante para a agricultura brasileira, sendo que no ano agrícola de 2005/06, sua produção correspondeu a 30,8 % da produção total de grãos no país, só perdendo para a soja, que representou 45,3 % da produção nacional (IBGE, 2006). Embora o milho seja uma importante cultura para o agronegócio brasileiro, praticamente toda a sua produção é consumida internamente, ao contrário da soja que concentra sua comercialização em mercados externos.

O plantio ocorre praticamente durante o ano todo. Devido a isto e, para facilitar o acompanhamento conjuntural denominou-se a cultura de acordo com a época de plantio: milho safra ou primeira safra, plantado de agosto a dezembro; e milho safrinha ou segunda

safra, plantado de janeiro a maio. O período mais expressivo para o plantio ocorre na safra, mas o milho safrinha vem ganhando espaço, desde a década de 80, como alternativa viável de atividade econômica e de produto para consumo próprio no período de outono-inverno.

No início da expansão do milho safrinha, os rendimentos eram muito baixos e os investimentos em insumos eram desprezíveis, pois safrinha era sinônimo de risco e baixa tecnologia. Os rendimentos médios ainda são baixos, em decorrência de parte da semeadura ser efetuada em época acentuadamente tardia (DUARTE, 2004), porém o lucro é maior por ser a colheita realizada em período de entressafra e ter menor custo de produção (TSUNECHIRO et al., 1995).

Atualmente, a tendência de preços elevados é ainda maior, devido a crescente demanda por milho para a produção de etanol, e ao aumento das importações do grão pela China. A maior parcela dos grãos produzidos é destinada ao preparo de rações para alimentação animal, principalmente de aves e suínos, e para a produção de óleo comestível.

Uma crescente parcela da produção de milho tem sido destinada à fabricação de produtos para a alimentação humana direta, tais como farinhas, cereais matinais, salgadinhos e xaropes de dextrose, indicando uma maior adoção do milho como fonte de alimento pelos brasileiros. A participação do milho tem crescido e deverá crescer ainda mais no setor da produção de plásticos biodegradáveis a partir de amido de milho (DA RÓZ, 2003) e na produção de etanol.

O Brasil planta em média 12 milhões de hectares de milho anualmente, sendo aproximadamente 70 % dessa área na safra e 30 % na safrinha. A produtividade média brasileira está em torno de 3200 kg ha⁻¹ na safra normal e 2200 kg ha⁻¹ na safrinha, produtividade baixa quando comparada à alcançada pelos produtores que adotam mais tecnologia e atinge 6 a 12 mil kg ha⁻¹ na safra, razão pela qual a produção de milho

ainda é menor que o consumo, sendo suplementado pela importação do exterior (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2000).

A importância do milho ainda está relacionada ao aspecto social, pois grande parte dos produtores brasileiros utiliza pouca tecnologia, não possui grandes extensões de terras, e cultiva para subsistência comercializando o excedente, fator que se reflete nas baixas produtividades médias. Portanto, pode-se, afirmar que há uma clara dualidade na produção de milho no Brasil: uma grande parcela de produtores que não estão envolvidos com a produção comercial e que atingem apenas baixos índices de produtividade, e uma pequena parcela de produtores, com elevado índice de produtividade, com aplicação intensiva de tecnologia e elevado investimento de capital na produção de milho (DUARTE, 2002).

Desta forma, a geração de tecnologias pelos órgãos de fomento deve levar em consideração não apenas a otimização do processo produtivo em sistemas com elevada aplicação de tecnologia, mas também favorecer o modelo de cultivo sob baixa tecnologia.

II.2 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Várias espécies diazotróficas vivem livres no solo. Nos sistemas agrícolas, as bactérias de vida livre são limitadas pela disponibilidade de fontes de carbono no solo. O potencial de algumas bactérias aeróbicas ou microaerófilas de vida livre, como o *Azotobacter spp* e *Azospirillum spp*, é demonstrado por meio da inoculação de palhada ou outros resíduos ricos em carbono e sua incorporação ao solo (HILL & PATRIQUIN, 1996), resultando em altas taxas de FBN (Fixação Biológica do Nitrogênio). Em solos sujeitos a inundação, outras classes de microrganismos diazotróficos, inclusive anaeróbios, contribui para o balanço de nitrogênio do sistema (ROPER & LADHA, 1995).

A capacidade dessa associação em contribuir com a fixação de nitrogênio para o crescimento das plantas foi demonstrada (DE-POLLI et al., 1977) e estimada por BODDEY et al. (1983). Organismos do gênero *Pseudomonas* formam um grupo heterogêneo (com muitas das espécies já reclassificadas), caracterizado por sua

versatilidade catabólica, que possibilita a utilização de uma faixa muito ampla de substratos como fonte de carbono.

Algumas espécies dentro desse gênero são diazotróficas e estima-se que sejam bem menos limitadas, quanto à fonte de energia, do que outros microrganismos diazotróficos de vida livre. Na rizosfera de algumas espécies vegetais, as espécies diazotróficas desse gênero costumam ser dominantes (CHEN et al., 1994).

Paspalum notatum é uma gramínea forrageira comum nas regiões tropicais, a qual se associa especificamente à espécie diazotrófica *Azotobacter paspali* (DÖBEREINER, 1966). A bactéria parece se estabelecer na rizosfera (região do solo sob influência das raízes) ou mesmo invadir as camadas externas do córtex de um dos ecotipos dessa gramínea, o ecotipo tetraplóide, *Paspalum notatum* batatais, na qual foi encontrada em 93% das cerca de duzentas e cinquenta amostras testadas. Muito raramente é encontrada associada a outros ecotipos ou espécies de *Paspalum spp*, não ocorrendo em outros gêneros de gramíneas (DÖBEREINER, 1970).

As espécies de *Beijerinckia spp* (*Beijerinckia dextrii*, *Beijerinckia mobilis*, *Beijerinckia indica* e *Beijerinckia fluminensis*), bastante tolerantes à acidez, são bactérias comuns nos solos das regiões tropicais, mas, também, são encontradas em regiões temperadas (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). A espécie *Beijerinckia indica* e *Beijerinckia fluminensis* têm sido freqüentemente encontradas em solos de canaviais e principalmente na rizosfera e rizoplane da cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1959). Parece ocorrer um enriquecimento seletivo em favor dessas bactérias nas regiões do solo próximas das plantas, onde exsudados radiculares são liberados, e também na área entre linhas de plantio, onde os exsudados foliares, lavados pelas chuvas, são depositados (DÖBEREINER & ALVAHYDO, 1959).

Pelo menos três espécies de *Bacillus spp* são descritos como diazotróficos: *Bacillus polymixa*, *Bacillus macerans* e *Bacillus azotofixans*. Esta última espécie é freqüentemente isolada de solo e raízes de cana-de-açúcar, trigo e outras gramíneas (SELDIN et al., 1984) e foi recentemente transferida para o gênero *Paenibacillus* (ROSATO et al., 1995). A característica interessante desta espécie está relacionada

com sua capacidade de FBN, mesmo em presença de níveis altos de nitrato e com a produção de substâncias antimicrobianas.

A espécie *Spirillum lipoferum* foi redescoberta no Brasil como bactéria diazotrófica associada à rizosfera e raízes de várias gramíneas (DÖBEREINER & DAY, 1976) e, logo depois, reclassificada como de um novo gênero *Azospirillum spp* (TARRAND et al., 1978). Sete espécies estão atualmente descritas: *Azospirillum largimobile*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum halopraeferans*, *Azospirillum irakense*, *Azospirillum doebereineriae* (DÖBEREINER et al., 1995b), e todas elas de ocorrência em regiões tropicais. Nestas duas décadas de pesquisa, um volume considerável de informações foi acumulado sobre as associações dessas bactérias com diversas espécies de gramíneas (BALDANI et al., 1996a).

O *Azospirillum spp* apresenta ampla distribuição nos solos (DÖBEREINER & DEPOLLI, 1980). Pouco se sabe, porém, sobre a sobrevivência do *Azospirillum spp* no solo na ausência da planta hospedeira, mas tem sido demonstrado que a bactéria apresenta vários mecanismos fisiológicos de proteção (formação de cistos, produção de melanina, de poli-hidroxibutirato), que podem facilitar a sobrevivência em condições desfavoráveis (DELGALLO & FENDIRIK, 1994). O *Azospirillum spp* é, entretanto, uma bactéria predominantemente rizosférica (MAGALHÃES et al., 1979; FREITAS et al., 1981).

O padrão de colonização das raízes das gramíneas pelas espécies de *Azospirillum spp* mostra uma tendência de especificidade entre grupos de plantas e as bactérias: *Azospirillum lipoferum* ocorre preferencialmente no córtex de milho, sorgo e de diversas outras gramíneas, mas foi também observada em uma espécie de ciperácea (DÖBEREINER, 1982), enquanto *Azospirillum brasilense* ocorre preferencialmente associado a trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e gramíneas (DÖBEREINER & DE-POLLI, 1980; ROCHA et al., 1981).

Azospirillum halopraeferans é mais específica, tendo sido isolada apenas de uma espécie de gramínea, o 'Kallar grass' (*Leptochloa fusca*), planta nativa do Paquistão,

altamente tolerante a solos salinos (REINHOLD et al., 1987). Já a espécie *Azospirillum irakense*, tem sido apenas isolada de raízes de arroz (KHAMMAS et al., 1989).

Os efeitos da colonização do *Azospirillum spp* sobre a morfologia e fisiologia das raízes das plantas com as quais se associam são marcantes (OKON & KAPULNIK, 1986). Têm sido observadas alterações na densidade e no comprimento dos pêlos radiculares, resultando no aumento da superfície do sistema radicular e permitindo melhor exploração dos nutrientes e água do solo (OKON et al., 1996). Tais efeitos são associados à capacidade deste e outros microrganismos diazotróficos rizosféricos liberarem substâncias promotoras do crescimento: AIA, giberelinas e citocininas (TIEN et al., 1979).

Certas linhagens de *Azospirillum spp* podem invadir as raízes, através da lamela média dos tecidos mais velhos, formando áreas transparentes, que surgem por hidrólise das células do vegetal por enzimas pectinolíticas, produzidas por essas bactérias (HUBBELL et al., 1978). Em plantas de milho crescidas no campo, a infecção dos tecidos das raízes e colmos pela bactéria ocorre apenas no período reprodutivo das plantas (MAGALHÃES et al., 1979), período em que também se observam as maiores taxas de atividade da nitrogenase (enzima responsável pela redução de N_2 a NH_3). Observações semelhantes já foram relatadas para arroz (WATANABE & BARRAQUIO, 1979) e trigo (KAVIMANDAN et al., 1978).

A infecção do interior das raízes de gramíneas não é característica generalizada das estirpes de *Azospirillum brasilense* e parece restrita à linhagem Sp245 (BALDANI et al., 1987; HARTMANN et al., 1995). Dentro da planta, as bactérias ficam livres da competição com os demais habitantes da rizosfera e as trocas de nutrientes entre estas e a planta hospedeira se tornam muito mais efetivas.

Apesar das propriedades fisiológicas do *Azospirillum spp* em meio de cultura já terem sido objeto de muitos estudos, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos envolvidos na interação planta/bactéria.

Dados acumulados em mais de 20 anos de pesquisa demonstram que, em 60-70% dos experimentos feitos, há um efeito benéfico da inoculação de *Azospirillum spp* sobre o crescimento ou produção de algumas culturas de cereais e até de leguminosas

(OKON et al., 1996). Em alguns desses experimentos, a inoculação com *Azospirillum spp* proporcionou incorporação de nitrogênio via FBN (GARCIA DE SALAMONE, 1993). Em Israel, onde o *Azospirillum spp* não ocorre abundantemente nos solos, tem sido possível observar efeitos benéficos da inoculação de *Azospirillum spp* sobre a produção de cereais, principalmente através da produção de substâncias promotoras de crescimento (OKON, 1985).

No Brasil, espécies de *Azospirillum* nativas ocorrem em abundância nos solos agrícolas, limitando a introdução de linhagens selecionadas. Porém, com o uso de estirpes selecionadas e marcadas com resistência a antimicrobianos, foi possível observar o efeito da inoculação do *Azospirillum brasilense* em plantas de sorgo, trigo (BALDANI et al., 1986a) e milho, sendo o efeito benéfico da inoculação de algumas linhagens (Sp245) relacionado principalmente com o melhor aproveitamento dos nitratos do solo (BODDEY et al., 1986; FERREIRA et al., 1987).

Muitas espécies de bactérias diazotróficas evoluíram no sentido de formar associações mais ou menos íntimas com as plantas, geralmente com as raízes e colmos de plantas superiores. Neste caso, a planta supre os compostos de carbono necessários para a FBN. Diversas espécies de microrganismos diazotróficos associadas com vegetais têm sido identificadas atualmente, inclusive espécies endofíticas, indicando que o número desses microrganismos pode ser bem maior do que foi estimado a princípio.

A importância econômica das gramíneas tem motivado os estudos na área e o Brasil é pioneiro no estudo dessas associações (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). O potencial da FBN em contribuir com nitrogênio para o crescimento de algumas espécies de gramíneas já foi demonstrado para algumas forrageiras, como o *Paspalum notatum* batatais, *Panicum maximum*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola* (DE-POLLI et al., 1977; BODDEY & VICTORIA, 1986; MIRANDA et al., 1990) e também para o arroz irrigado (APP et al., 1986; BODDEY et al., 1995). É muito provável, porém, que a FBN detectada nessas plantas seja o resultado da atividade não de uma, mas de várias espécies de microrganismos diazotróficos associados a elas.

O interior das plantas representa um habitat rico em substratos de carbono e livre de diversos fatores adversos que limitam as populações de bactérias no solo e rizosfera. A colonização endofítica de plantas sempre foi, entretanto, considerada restrita a bactérias fitopatogênicas. Bactérias diazotróficas endofíticas, predominantemente, trouxe uma nova dimensão aos estudos das associações de microrganismos diazotróficos e plantas superiores. Os diazotróficos endofíticos não sofrem limitação de substâncias ricas em carbono, estão livres de competição com outros microrganismos e podem transferir muito mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos para a planta (NEVES, 1985).

Herbaspirillum seropedicae pode ser isolado de arroz, milho e sorgo (BALDANI et al., 1986a), de raízes, folhas e colmos de *Pennisetum purpureum*, cana-de-açúcar e diversas gramíneas invasoras (OLIVARES et al., 1996). A bactéria sobrevive muito mal no solo, desaparecendo em menos de trinta dias após sua inoculação com grande número de células (BALDANI et al., 1996a). *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (previamente *Pseudomonas rubrisubalbicans*, BALDANI et al., 1996a) vive associado à cana-de-açúcar, podendo esta causar uma doença conhecida como "estria mosqueada" em algumas cultivares. Através da microscopia eletrônica é possível observar a intensa colonização dos tecidos vasculares da cana-de-açúcar pelas duas espécies de *Herbaspirillum spp.*

Um novo gênero de microrganismo diazotrófico endofítico está sendo objeto de estudos recentes: *Burkholderia spp.*, foi reclassificado a partir de linhagens antes incluídas no gênero *Pseudomonas spp.* (YABBUCHI, KOSAKO et al., 1992). Estirpes pertencentes a diferentes espécies dentro desse gênero foram isoladas de arroz no Vietnã (TRAN VAN, GILLIS et al., 1994) e de cana-de-açúcar, batata-doce, mandioca e arroz, no Brasil (BALDANI et al., 1996a). A lista de microrganismos diazotróficos endofíticos compreende também as espécies de *Azoarcus spp.* (REINHOLD, HUREK et al., 1993), de ocorrência restrita à espécie de gramínea *Leptochloa fusca* (Kallar grass).

II.3 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

O fósforo é o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal, ficando atrás apenas do nitrogênio. Este elemento é o principal componente de combinações vitais como a lecitina, nucleotídeos, entre outras, estando relacionado aos fenômenos de armazenamento e transferência de energia na planta, sob a forma de ATP (FORNASIERI FILHO, 1992).

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

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

Na forma solúvel, se apresenta em baixa concentração nos solos, em níveis de 1 ppm (H_2PO_4^-) ou menos. A maioria dos solos agrícolas contém grandes reservas de fósforo acumulado como consequência de aplicações regulares de fertilizantes. Contudo, uma grande porção é rapidamente imobilizada após a aplicação, pois dependendo do pH e tipo de solo, torna-se indisponível as plantas (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999). Uma solução pode ser a utilização de processos microbiológicos para aproveitar o fosfato de rochas (ZAPATA e AMANN, 1995). Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfato inorgânico. Entre os gêneros com essa capacidade estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999).

A principal fonte de P para o solo é de minerais primários, como as apatitas. Em

segundo lugar vem a matéria orgânica do solo, que pode constituir 30 a 50 % do P do solo; este P orgânico está principalmente na forma de fosfato-inositol (fitato), sintetizado por microrganismos e plantas. Diferentes espécies de bactérias foram identificadas como capazes de solubilizar compostos fosfatados inorgânicos, como os fosfatos di e tricálcico, hidroxiapatitas e rochas fosfatadas. Existem populações consideráveis deste grupo de bactérias no solo e na rizosfera vegetal (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999). A solubilização de P também está relacionada a fatores ambientais como níveis nutricionais e interação com outros organismos do ambiente, assim como outras formas já discutidas de promoção do crescimento de plantas.

Apesar dos teores de fósforo no solo serem relativamente elevados (400 a 1200 mg/kg de solo), a concentração de P solúvel, disponível para assimilação pelas raízes vegetais é muito baixa, normalmente 1 mg/kg de solo ou menos (RAGHOTHAMA, 1999). Seu ciclo não possui intercâmbio com a atmosfera, sendo regido principalmente por microrganismos. Portanto, a capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, pois esta característica apresenta um grande potencial para a promoção de crescimento vegetal.

É interessante ressaltar que as bactérias endofíticas com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico ganham importância durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, provê-lo deste mineral essencial para o desenvolvimento vegetal.

Mesmo a diversidade de bactérias solubilizadoras de P presentes no solo sendo grande, os níveis populacionais observados geralmente são baixos para que ocorra uma competição com outras bactérias comumente associadas à rizosfera. Para que a quantidade de P liberado por estes organismos seja suficiente para promover o crescimento vegetal, deve-se promover a inoculação destes organismos em concentrações elevadas. A co-inoculação de espécies solubilizadoras de P com espécies diazotróficas, bem como o uso conjunto de fungos micorrízicos arbusculares pode prover uma nutrição vegetal mais equilibrada e apresentar efeitos sinérgicos na promoção do crescimento (BELIMOV et al., 1995; KUNDU & GAUR, 1984).

O principal mecanismo de ação na solubilização de P mineral é através dos ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos, o que também promove a acidificação da célula microbiana e o ambiente ao seu redor. Entre estes ácidos, o ácido glucônico aparece como o agente mais freqüente de solubilização. Outros ácidos envolvidos na solubilização de fosfatos são os ácidos 2-cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, e acético (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

Além dos ácidos orgânicos, a liberação de prótons H^+ para a superfície celular externa nos processos de absorção de cátions ou através do auxílio das ATPases, a produção de substâncias quelantes ou a produção de ácidos inorgânicos (sulfídrico, nítrico e carbônico), podem constituir mecanismos alternativos na solubilização de fosfatos inorgânicos.

A solubilização de fosfatos orgânicos, também chamada mineralização, ocorre a partir de restos vegetais e animais contendo elevados teores de compostos fosfatados. Numerosas espécies saprofíticas realizam a decomposição da matéria orgânica do solo, que liberam o radical ortofosfato da estrutura de carbono da molécula, por processos de respiração e sob forte influência de fatores ambientais. As principais moléculas fornecedoras de P através da mineralização são os ácidos nucléicos, fosfolipídeos e açúcares fosfatados, facilmente degradados, e o ácido fítico, polifosfatos e fosfonatos que são mineralizados mais lentamente.

Esta mineralização é promovida por enzimas chamadas fosfatases, ou fosfohidrolases, classificadas em ácidas ou alcalinas de acordo com o pH ótimo de atividade.

Estas enzimas podem ser secretadas fora da membrana plasmática, ou permanecerem retidas na membrana como proteínas solúveis (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

II.4 FITOHORMÔNIOS

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas, influenciando os processos fisiológicos em baixas concentrações.

Microrganismos endofíticos têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio e/ou produção de fitohormônios) e por mecanismos indiretos (antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas).

Alternativas envolvendo a aplicação de agentes microbianos para prevenção e controle de doenças e pragas na agricultura têm sido destacadas (SOUZA, 2001). Em mudas micro propagadas de bananeira poderiam ser aplicadas bactérias diazotróficas no sentido de reduzir o uso de agrotóxicos e convergir para um sistema de produção integrada de frutas. A produção integrada, de acordo com SILVA et al. (2001), consiste em obter uma produção econômica de alta qualidade, com prioridade a métodos ecologicamente mais seguros, minimizando aplicações de agroquímicos e os seus efeitos secundários negativos, para promover a proteção do ambiente e a saúde humana.

Entretanto, o conhecimento do genótipo da planta e do microrganismo envolvido na promoção é de extrema importância. Neste aspecto, bactérias endofíticas dos gêneros *Gluconacetobacter spp*, *Acinetobacter spp*, *Actinomyces spp*, *Agrobacterium spp*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Burkholderia spp*, *Curtobacterium spp*, *Pantoea spp*, *Pseudomonas spp* e *Xanthomonas spp* podem promover o crescimento vegetal. (PATTEN & GLICK, 1996)

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por microrganismos endofíticos ainda necessita de mais estudos para um melhor entendimento dos fatores envolvidos. Além da interação entre o genótipo da planta e a comunidade endofítica promotora de crescimento, outros fatores interagem neste processo, como as comunidades microbianas epifíticas e da rizosfera. Neste aspecto, foi observado que a promoção de crescimento vegetal por endófitos pode ser influenciada pela rotação da cultura, interação com patógenos, fixação de nitrogênio e síntese de fitohormônios.

Os fitohormônios podem ser classificados como: citocinina, giberelina, etileno e auxina. Estudos fisiológicos sugerem muitas ligações entre os fitohormônios. Diversos outros hormônios modulam ou são modulados pelos níveis de auxina (DEMASON, 2005).

As citocininas são 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). Atuam também em associação com as auxinas no controle da dominância apical. As citocininas também retardam o envelhecimento das plantas. Uma das histórias mais-ditas na biologia da planta é o relacionamento entre a auxina e a citocinina, que pode ser empregado *in vitro* para induzir o desenvolvimento da raiz (SKOOG & MOLEIRO, 1957).

Os níveis de auxina e de citocinina são correlacionados inversamente *in vivo* (EKLÖF et al., 2000) e o tratamento com a auxina pode rapidamente inibir a biossíntese de citocinina (NORDSTRÖM et al., 2004). Ramos e flores cortados e colocados em água envelhecem rapidamente pela falta de hormônio. A adição de citocinina na água dos vasos faz com que as flores cortadas durem bem mais tempo. É uma prática comum no comércio de plantas pulverizar citocinina sobre flores colhidas com a finalidade de retardar seu envelhecimento.

Em 1926 o cientista japonês E. Kurosawa descobriu uma doença em plantas de arroz causada por um fungo do gênero *Gibberella*. 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 diversas funções (MALONEK et al., 2005).

As giberelinas são hormônios produzidos principalmente nas raízes e nos brotos foliares, que atuam estimulando o crescimento de caules e folhas, mas têm pouco efeito sobre o crescimento das raízes. Juntamente com as auxinas, as giberelinas atuam no desenvolvimento dos frutos. As giberelinas desempenham junto com as citocininas, importante papel no processo de germinação das sementes. Como o etileno, a auxina inicia a produção do ácido giberélico GA (ROSS et al., 2000), e a auxina transportada é necessária para a produção das giberelinas na cevada (WOLBANG et al., 2004). O gás etileno pode promover a degradação do gene repressor *DELLA* (SILVERSTONE et al.,

2001), enquanto o transporte da auxina impossibilita a degradação de GA mediada pela proteína DELLA (FU & HARBERD, 2003).

O etileno, único fitohormônio na forma de gás, é produzido em diversas partes da planta e difunde-se no ar existente entre as células. Atua no amadurecimento dos frutos e na abscisão das folhas, juntamente com a auxina. Esse hormônio, etileno, enfraquece as células a tal ponto que o peso da folha é suficiente para romper sua ligação com o caule. A folha então se destaca e cai. A auxina e o etileno gasoso são ligados também intimamente. A exposição exógena da auxina estimula a produção do etileno (MORGAN, 1962) com a indução de um gene que codifica uma enzima da biossíntese do etileno (ABEL et al., 1994). Inversamente, o etileno inibe (SUTTLE, 1988) o transporte lateral e longitudinal da auxina (BURG & BURG, 1966).

II.4.1 AUXINAS

O termo auxina foi criado pelos cientistas que examinavam substâncias de crescimento da planta na urina humana nomeado de auxinas A e B (KÖGL & HAAGEN SMIT, 1931), as quais foram gradualmente descartadas. Um composto estrutural distinto com atividade de auxina isolado de fungos foi chamado heteroauxina, atualmente classificada como heteroauxina bioativa, a qual foi determinada mais tarde como 3-ácido indol acético (AIA) (THIMANN, 1977).

Auxina significa em grego "crescer" e o nome é dado a um grupo de compostos que estimulam o crescimento. O ácido indol acético (AIA) é a forma predominante. Evidência sugere que existem outras auxinas indólicas naturais nas plantas, além do AIA, outros compostos sintéticos também favorecem o crescimento das células: o ácido indenoacético, o ácido 2-benzofuranacético, o ácido 3-benzofuranacético, o ácido naftalenacético.

Posteriormente, se observou que outros compostos que possuem anel indólico também promovem o crescimento, como o ácido 3-indolpirúvico, o ácido indolbutírico derivados do naftaleno como o ácido naftil-1-acético e o ácido naftoxi-2-acético. Por último, alguns ácidos fenoxiacéticos com atividade auxínica levaram o descobrimento

do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) com uma grande atividade. Este foi o ponto de partida para descoberta de uma gama de moléculas com atividade auxínica, como o ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (AMCP) e o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ambos com propriedades herbicidas quando empregados em concentrações elevadas e utilizados como armas químicas na guerra do Vietnã.

A principal auxina encontrada nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA. Essa substância é produzida principalmente no meristema apical (gema) do caule e transportada através das células do parênquima até as raízes. O transporte do AIA é unidirecional, dependendo de energia para ocorrer. Se um pedaço de caule é invertido, o AIA continua a se deslocar em direção à extremidade das raízes, contra a força de gravidade.

O principal efeito da auxina é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, no entanto, da concentração do hormônio. Em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular. As técnicas de cultivo de tecidos foram possíveis graças à ação das auxinas sobre a divisão celular. Em concentrações muito altas a auxina inibe o alongamento celular e, portanto, o crescimento do órgão. A sensibilidade das células à auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível à auxina que a raiz.

II.5 A IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos elementos mais abundante nas plantas como constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas. No solo o nitrogênio disponível para as plantas pode estar na forma de nitrato, amônia, aminoácidos, peptídeos e purinas, sendo encontrados transportadores de membranas para todas estas formas (WILLIAMS & MILLER, 2001).

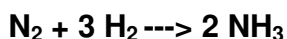
Embora presente na atmosfera em aproximadamente 78% da constituição gasosa, é encontrado na forma molecular (N_2), a qual não é absorvível pelas plantas, já

que a maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de íon nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (FERNANDES & SOUZA, 2006).

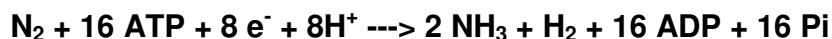
A forma mais comumente absorvida é de nitrato, já que o nitrogênio amoniacal liberado pela decomposição da matéria orgânica do solo é rapidamente convertido a nitrato por bactérias quimiossintetizantes. Porém sob condições de pH muito ácido, altas concentrações de fenóis ou anoxia, a amônia não é oxidada e algumas plantas a absorvem nesta forma.

Os átomos de nitrogênio presentes na molécula de N_2 encontram-se unidos de uma maneira muito estável. Por esse motivo para que o N_2 possa ser convertido a uma forma assimilável é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial), processo esse que consome muita energia e encarece o preço do kg de N, ou a presença de um sistema enzimático apropriado (fixação biológica).

A fixação industrial do N_2 , chamada de processo de Haber-Bosch, utiliza temperaturas em torno de 200°C e pressões em torno de 200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético (TAIZ & ZEIGER, 2004).



No processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), organismos procariotos são capazes de assimilar o N_2 atmosférico e convertê-lo a forma assimilável (NH_3). A FBN ocorre graças à enzima nitrogenase, o que do ponto de vista energético é dispendioso para o organismo que a realiza, sendo que a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica graças a um sistema enzimático apropriado (REIS et al., 2006).



(onde e^- simboliza elétron e Pi simboliza o fosfato inorgânico).

O processo industrial converte cerca de $80 \times 10^{12} \text{ g.ano}^{-1}$ de Nitrogênio molecular em amônia, enquanto, que a fixação por processos naturais converte cerca de $190 \times 10^{12} \text{ g.ano}^{-1}$. Deste total fixado por processos naturais, os relâmpagos são responsáveis por cerca de 8%, as reações fotoquímicas, entre óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O_3), produzindo o ácido nítrico (HNO_3), por cerca de 2% e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias ou algas azuis responsáveis por aproximadamente 90%. Daí a importância em se estudar a FBN em bactérias fixadoras e não fixadoras.

II.6 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes minerais críticos para a produção vegetal porque seu suprimento no solo é limitado. Cerca de 78 % da constituição gasosa da atmosfera é formada por nitrogênio molecular (N_2). No entanto, os organismos eucariontes e a maioria dos procariontes são incapazes de absorver o N_2 e convertê-lo a uma forma assimilável assim, somente formas mais reduzida deste elemento podem ser assimiladas pelos organismos vivos.

Os dois átomos de N encontram-se unidos de maneira muito estável por uma tripla ligação. Por esse motivo, para que o N_2 possa ser convertido a uma forma assimilável, é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial) ou a presença de um sistema enzimático apropriado (fixação biológica).

. Os microrganismos do solo possuem como principal fonte de nitrogênio materiais vegetais (como restos de cultura, adubo verde ou serapilheira) ou de natureza animal, fertilizantes industriais, sais de amônio e nitratos trazidos pela precipitação, e a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por microrganismos conhecidos como diazotróficos. (CARDOSO, 1992).

A (FBN) é a maior responsável pelo aporte de nitrogênio nos sistemas biológicos, contribuindo com cerca de 65% do nitrogênio fixado (NEWTON, 1999). Este processo

consiste na transformação do nitrogênio molecular (N_2) em formas mais reduzidas, como NH_3 , que podem ser assimiladas pelos organismos vivos.

Diversas bactérias, como *Rhodospirillum spp* e algumas bactérias fotossintéticas, são fixadoras de nitrogênio (KAMEN & GEST, 1949; KAMEN, 1953), assim como uma grande variedade de bactérias do solo, semelhantes à *Pseudomonas spp*. (ANDERSON, 1955).

Grande parte dos microrganismos diazotróficos, evoluiu no sentido de colonizarem a rizosfera das plantas, beneficiando-se assim dos compostos ricos em carbono, que são exsudados pelas raízes (SPRENT & FARIA, 1989).

Um grande número de plantas cultivadas mantém em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos. Muitas dessas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria, inclusive promovendo a formação de estruturas especializadas que garantem proteção contra fatores adversos do solo (SPRENT & FARIA, 1989).

A exploração agrícola da FBN nos países desenvolvidos tem sido motivada pela conscientização ecológica sobre o uso intensivo e, às vezes, abusivo dos agroquímicos além de representar uma diminuição no custo da produção. Esta ainda não é a grande preocupação em muitos países em desenvolvimento. De um modo ou de outro, a exploração agrícola da FBN depende do profundo conhecimento das bactérias diazotróficas, suas relações com as plantas superiores e com os demais membros da microflora do solo e da rizosfera.

Pesquisadores da Índia (RAO, 1983; GHAI & THOMAS, 1989) isolaram bactérias do gênero *Azospirillum* da rizosfera. Pesquisadores brasileiros (WEBER, 1998; WEBER et al., 1999; WEBER et al., 2001), do grupo de J. Döbereiner identificaram várias bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. O número de espécies diazotróficas vem aumentando devido à importância destas nos sistemas agrícola. Estas podem ser de forma geral agrupadas em bactérias diazotróficas de vida livre e bactérias diazotróficas associativas.

II.7 CONTRIBUIÇÃO DA FBN NA CULTURA DO MILHO

O milho possui uma via fotossintética (via C4) mais eficiente que as leguminosas, e com isso é capaz de converter intensidades de energia solar duas vezes maiores. Esse tipo de planta pode mais facilmente dispensar fontes energéticas para a alimentação de bactérias diazotróficas e o processo energeticamente caro da conversão do N₂ atmosférico em formas combinadas utilizáveis pelas plantas (DÖBEREINER, 1992).

Por isso, quando se tem uma planta com uma estratégia fisiológica tão competente, provavelmente pouco será notado das possíveis contribuições a partir das interações destas com microrganismos e, qualquer real contribuição numa cultura plantada em tão larga escala, facilmente se constitui em dividendos para a agricultura.

Em regiões de clima tropical e subtropical, as temperaturas do solo, durante todo o ano, são mais favoráveis aos processos microbiológicos em geral. No entanto, a rápida decomposição da matéria orgânica e os altos níveis pluviais que favorecem a desnitrificação e lixiviação de compostos nitrogenados contribuem para a dependência da aplicação de fertilizantes nitrogenados (DÖBEREINER, 1992).

Mesmo dependente, devido à falta de subsídios para fertilizantes, o Brasil aplica níveis de N ha⁻¹ abaixo do que é assimilado pela planta. Isso acarretou, ao longo de décadas, em diversas culturas, a seleção natural ou melhoramento de genótipos com capacidade de se associarem com bactérias fixadoras de N₂, obtendo-se assim grande parte do N necessário através da FBN.

Talvez, por esta razão, o Brasil tenha assumido a liderança nas pesquisas sobre produção com níveis muito baixos de adubação nitrogenada, sem diminuição da produtividade. Um exemplo disto é a cana-de-açúcar, que mesmo com aplicações mínimas de fertilizante nitrogenado, mantém sua nutrição nitrogenada sem esgotamento do solo.

Em plantas de milho, a maioria dos experimentos foi conduzida com a inoculação de *Azospirillum*, mostrando variáveis aumentos de aproximadamente 25 % (KENNEDY

et al., 2004). Esta contribuição das bactérias é maior quando a planta recebe doses variáveis de fertilizante nitrogenado (DOBBELAERE et al., 2003).

Nos Estados Unidos um produto com o nome de Azo-GreenTM foi produzido e recomendado para aumentar o vigor da semente, aumento do sistema radicular, resistência a geada e uma melhoria geral da saúde da planta (FALLIK & OKON, 1996).

Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto com nome comercial de Zea-NitTM, contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (Br17) comercializado na forma de mistura com vermiculita ou em forma líquida. Segundo os fabricantes, este produto reduziria a aplicação de 30 a 40 % do nitrogênio necessário à cultura (OKON et al., 1994).

No México, foi desenvolvido um inoculante denominado “Fertilizante para milho”, e tem sido usado com sucesso visto a sua aplicação em 5000 ha no ano de 1993 (PAREDES-CARDONA et al., 1988 e CABALLERO-MELLADO et al., 1992). A Argentina lançou um produto denominado GraminanteTM a base de pó de carbonato de cálcio contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum*. Os fabricantes informam que o produto pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20 % (OKON et al., 1994).

GARCÍA DE SALAMONE et al. (1996) testaram quatro genótipos de milho quanto à contribuição da FBN, inoculando com *Azospirillum* e utilizando solo marcado com ¹⁵N. De acordo com os resultados de ¹⁵N, ocorreu contribuição significativa da FBN nos genótipos Dekalb 4D 70 e CMS 22 plantados na Argentina. RIGGS et al. (2001) observaram que os sintomas de deficiência de N não foram amenizados por nenhuma das 23 estirpes de bactérias diazotróficas usadas em plantas de milho, tanto em vaso como no campo, mas não mediram a contribuição da FBN.

O número de trabalhos com inoculação de *Azospirillum* diminuiu nos últimos anos, pois apresentavam respostas positivas, porém variáveis. Mais interesse foi dado a bactérias endofíticas, como os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Os altos números nos tecidos das plantas de milho tornaram estas bactérias promissoras para o suprimento de nitrogênio nos sistemas agrícolas, e será avaliado neste estudo o desempenho de um isolado pertencente ao gênero *Burkholderia* entre outros quanto a

este problema.

II.8 A IMPORTÂNCIA DE TÉCNICAS MOLECULARES NO ESTUDO DA IDENTIFICAÇÃO E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

O uso da taxonomia tradicional não supre as necessidades para o conhecimento de uma espécie bacteriana, tendo em vista a necessidade de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico (CANHOS et al., 1997). A partir da década de 80, um grande número de metodologias moleculares vem sendo desenvolvido para análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN et al., 1995; BORNEMAN et al., 1997; CULLEN e HIRSCH, 1998; SANDAA et al., 1998), tornando-se cada vez mais rotineiras (DROZDOWICZ, 1997).

Tais metodologias utilizam o DNA genômico total, extraído diretamente do meio ambiente e amplificações via PCR, tornam possível a identificação dos microrganismos ainda desconhecidos e não cultivados (BORNEMAN et al., 1996; CANHOS et al., 1997; DROZDOWICZ, 1997, VALADARES-INGLIS e MELO, 1998; DOJKA et al., 1996; MACRAE, 2000; KENT e TRIPLETT, 2002).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (LUDWIG, et al., 1997; KUSKE et al., 1997; HENTSCHEL, et al., 2002). Os estudos com o Gene 16S rRNA foram iniciados por Carl Woese que argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular (ATLAS e BARTHA, 1998).

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 Eucaria. Os genes dos rRNA em todos os organismos contemporâneos partem de um ancestral comum e eles não parecem submeter-se à transferência lateral de gene entre espécies. Por causa das unidades funcionais,

grandes porções nos genes rRNA são bem conservadas e suas seqüências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados.

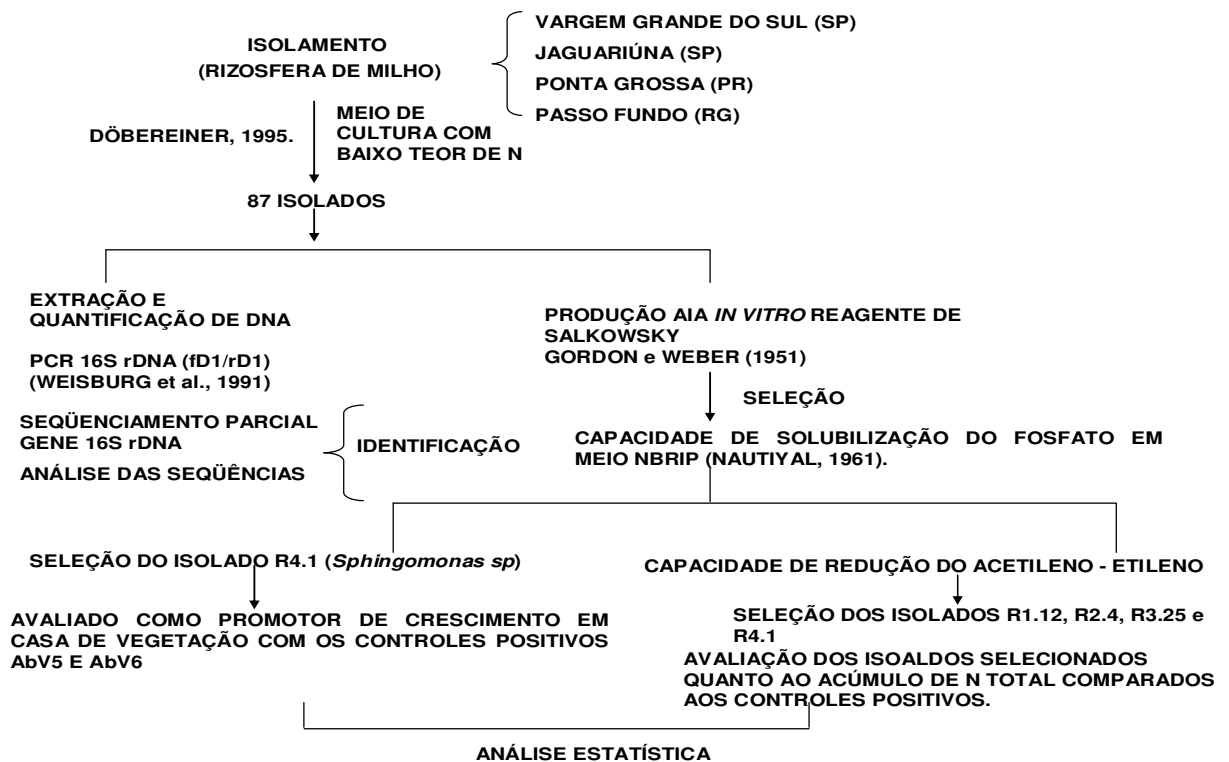
Variações nas seqüências dos nucleotídeos do gene de rRNA são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises do gene 16S rRNA revelaram separação dos domínios Bactéria, Archaea e Eucaria. Estudos filogenéticos moleculares proporcionam uma idéia de evolução em grande escala; quando vista desta maneira mostram a importância dos microrganismos na história evolutiva da vida na Terra, que não pode ser ignorada (ATLAS e BARTHA, 1998).

Com a evolução da aplicação das técnicas moleculares para o estudo da microbiota do solo, inúmeros métodos de extração de DNA foram aperfeiçoados. Tais métodos possuem procedimentos que envolvem a quebra ou digestão de paredes e membranas celulares para possibilitar a liberação do conteúdo genético da célula.

III. MATERIAIS E MÉTODOS:

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), situado no departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP Câmpus de Jaboticabal-SP. As plantas utilizadas são de quatro regiões diferentes do Brasil e foram colhidas aos 153 dias de desenvolvimento. Uma síntese das etapas empregadas neste estudo, pode ser visualizada no fluxograma abaixo.

III.1 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL:



III.2 ISOLAMENTO DAS ESTIRPES SELVAGENS EM PLANTAS DE MILHO:

As raízes utilizadas foram de plantas de milho híbrido (Impacto), coletadas das seguintes regiões: Jaguariúna (SP) – R.1, Passo Fundo (PR) – R.2, Ponta Grossa (RS) – R.3 e Vargem Grande do Sul (SP) – R.4. Para isolamento e cultivo dos microrganismos seguiu-se o protocolo descrito por DÖBEREINER (1995) que consiste em lavar as raízes em água corrente, retirar 15 g, secar e desinfetar superficialmente, com as seguintes etapas: imersão das raízes por 10 min em cloramina-T a 1%, 10 min em água destilada estéril, 10 min em tampão fosfato e 10 min em água destilada estéril.

Porções de 10 g de raízes desinfetadas foram trituradas com 90 mL de solução salina (8,5 g L⁻¹ de NaCl) e, então, realizaram-se diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁷, tendo-se transferido sucessivamente 10 mL da suspensão, de cada diluição, para frascos com 90 mL de solução salina. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 µL

foram plaqueadas em triplicata, em placas de vidro contendo os meios semi-sólidos livres de N: (NFb, JNFb) e meio sólido DYGS.

Um teste inicial de germinação de sementes de milho na presença dos isolados foi realizado em condições assépticas (Apêndice I).

III.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA.

Para extração do DNA dos isolados utilizou-se a metodologia proposta por MARMUR (1961).

Os DNAs extraídos e quantificados foram amplificados pela reação de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA bacteriano pela reação contendo tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], 200 µM de cada desoxiribonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e água milli-Q estéril para completar um volume final de 50 µL.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos utilizados por, (WEISBURG et al., 1991) *fD1* "forward" (5'-CCg AAT TCg TCg ACA ACA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g – 3') e o *rD1* "reverse" (5'-CCC ggg ATC CAA gCT TAA ggA ggT gAT CCA gCC -3') . As amostras foram amplificadas em um termociclador de acordo com o programa utilizado por: 94°C, por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72°C. A quantificação e visualização do produto de PCR 16S rDNA foi realizada em gel de agarose a 1,5% juntamente com um marcador de 1500 pb e fotodocumentadas no aparelho Gel Doc (Bio Rad).

III.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA:

As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas utilizando o kit "DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism" versão 3.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se 0,5 µL dos terminadores Big Dye; 3,2 pmoles dos iniciadores “forward” *fD1*; 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) completando-se a reação com H₂O mili-Q estéril para 10 µL.

A reação de seqüenciamento foi submetida a um programa de termociclagem conforme descrito anteriormente, no item III.3.

Após a reação, as amostras foram preparadas para o seqüenciamento. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g, por 45 minutos, a 20°C. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e as amostras foram deixadas por 5 minutos, invertidas em papel absorvente. Aos precipitados foram adicionados 150 µL de etanol 70%, centrifugadas a 3.220 x g por 5 minutos, a 20°C. Esta última operação foi repetida por mais duas vezes e as amostras foram secas em fluxo laminar por 1 hora.

Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9 µL Hi-Di Formamide – Catálogo – P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 minutos. O seqüenciamento dos isolados foi realizado no seqüenciador capilar modelo ABI 3700 – Perkin Elmer.

III.5 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS

Para se verificar a qualidade das seqüências geradas utilizou-se o programa “Sequencing Analysis 3.4”, que gerou os eletroferogramas que foram submetidos à análise pelo programa “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al., 1998). A seleção das seqüências adequadas foi realizada pelo programa Phred, o qual analisa a qualidade das seqüências, visualizando graficamente pelo Consed e gerando arquivos no formato “fasta”, na qual o nível de exigência mínima foram de 250 bases com qualidade Phred acima de 20, auxiliado pelo programa “Contgen.pl”

Preliminarmente, as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de

nucleotídeos, com seqüências depositadas no banco de dados GenBank acessado através do “site” do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997).

As seqüências foram preparadas para o alinhamento pelo programa “BioEdit v5.0.9” (HALL, 1999) e alinhados pelo programa “CLUSTALX v.1.81” (THOMPSON et al., 1997).

III.6 DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DO AIA

Os isolados foram submetidos à avaliação da produção de ácido indol-acético (AIA) pelo uso do método quantitativo colorimétrico descrito por GORDON e WEBER (1951), com algumas modificações. Primeiramente as bactérias foram inoculadas e cultivadas em 50 mL de meio de cultura DYGS suplementado com 100 µg/mL de triptofano, no escuro, a 30°C e agitação constante de 150 rpm. As bactérias foram avaliadas em três diferentes estágios: quando o cultivo atingiu a DO₆₀₀ (Densidade ótica 600 nm) de 0,8, de 1,5 e de 3,5, com o ajuste da densidade bacteriana pela adição de solução salina 0,85%.

Depois de atingido cada período de cultivo nas densidades citadas, uma alíquota de 1,5 mL foi retirada de cada amostra e centrifugada durante 10 minutos, a 7.000 xg e temperatura de 15°C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para tubo de ensaio de vidro de 25 mL, sendo adicionados 2 mL do reagente de Salkowisk (FeCl₃.6H₂O 2% e HCl₃ 37%) (Sarwar & Kremer, 1995).

Os tubos foram mantidos no escuro por 30 minutos. A presença do hormônio foi visualizada pela coloração rósea e quantificada pela absorbância a 530nm em um espectrofotômetro. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. Como controle negativo utilizou apenas o meio de cultura DYGS. Para a estimativa de produção de AIA, utilizou-se uma curva-padrão com Ácido Indol-acético (Sigma), com 98% de pureza, nas seguintes concentrações: 0,5, 10, 25, 50, 75 e 125 µg/mL.

III.7 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

O teste de solubilização do fosfato foi realizado quanto à capacidade *in vitro* em solubilizar fosfato pelo uso do meio sólido NBRY (NAUTIYAL, 1999) contendo fosfato insolúvel.

Os isolados foram incubados a 28°C por 15 dias observando em dias diferentes a presença ou ausência de halo ao redor das colônias indicativo ou não de solubilização do fosfato.

III.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA NITROGENASE VIA REDUÇÃO DE ACETILENO (ARA)

A fixação de nitrogênio atmosférico dos isolados foi medida pela redução do acetileno em etileno, pois o acetileno é um inibidor competitivo do nitrogênio na enzima nitrogenase. A metodologia empregada foi baseada no trabalho de XIE, et al. (2003), com o cultivo das estirpes AbV5 e AbV6, das espécies de *A. brasilense* e dos isolados rizosféricos de plantas de milho (positivos para solubilização) em meio DYGS até atingirem a densidade ótica de 0,8, a 600nm. Alíquotas de 100 µL de cada cultivo foram retiradas e aplicadas, em triplicata, em tubos de ensaio contendo meio semi-sólido NFb com baixa concentração de nitrogênio (ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, et al., 2001), com capacidade de 50 mL e vedados com tampas de borracha. Cada triplicata foi incubada em BOD, por 48 e 96 horas, a 30°C.

Após estes períodos 1/10 do ar dos tubos foi retirado e um volume igual de acetileno foi injetado. Os tubos foram incubados novamente por 24 horas a 30°C. Como controle negativo foi utilizado um tubo de ensaio sem o inóculo bacteriano. Após a incubação, a produção de etileno foi avaliada pela retirada de uma alíquota de 100 µL do ar contido nos tubos com o auxílio de uma seringa de vidro específica para injeção de gás. (Dynatec A-2).

A dosagem do etileno foi realizada em cromatógrafo a gás (SHIMADZU – mod. GC14B) acoplado a um módulo CBM-102. As temperaturas da câmara, do detector de

injeção e da coluna foram de 60°C, 100°C e 60°C, respectivamente. Foi utilizado como padrão 138 ppm de gás etileno e o valor de ARA foram dosados por nmol de etileno produzido por hora de incubação e calculado usando a fórmula abaixo:

$$ARA = V_{st} \times C_{st} \times A_{sa} \times V_{tu} / V_{sa} / A_{st} / H / 22.4 \times 10^6$$

$$ARA \text{ (nmol } C_2H_4 \cdot H^{-1} \cdot \text{ Cultura}^{-1})$$

Onde, V_{st} é o volume inicial do gás injetado (mL), C_{st} é a concentração do gás padrão (etileno), A_{sa} é a área de curva produzida do etileno no cromatógrafo (cm²), V_{tu} é o volume do gás utilizado (mL), V_{sa} é o volume de amostra do gás injetado (mL), A_{st} é a área de curva do gás injetado do acetileno (cm²) e H o tempo de incubação em horas.

III.9 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS DE MILHO INOCULADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO:

Os experimentos de inoculação foram conduzidos em casa de vegetação e as variáveis avaliadas correspondem à biomassa seca, altura da planta e acúmulo de N, sendo a seguinte ordem: primeiramente as sementes de milho, híbrido Impacto, sem tratamento, foram desinfetadas superficialmente pela aplicação de etanol 70%, por 3 vezes durante 5 minutos, em seguida embebidas em hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, lavados várias vezes com água deionizada. Após esse procedimento ficaram embebidas em água estéril por duas horas. A seguir parte das sementes foram transferidas para meio sólido LB e incubadas em BOD por 48 horas a 30° C para verificar se o processo de desinfecção foi eficiente.

O solo utilizado nestes experimentos foram caracterizado como solo Latossolo Vermelho-Escuro com as seguintes características pH 4,8, M.O. 16g/dm³, P 24 mg/dm³, K 1,1, Ca 15, Mg 3, H+Al 31, SB 19, T 50 mmol_c/dm³ e V% 38. O plantio foi realizado em vasos de 5Kg e a semeadura feita com quatro sementes por vaso. Após emergência, foi realizado o desbaste mantendo-se apenas uma planta por vaso para conduzir o experimento.

No primeiro experimento avaliou-se a eficiência do isolado como promotor de crescimento, os tratamentos foram inoculados com 100 μL da suspensão bacteriana a 10^8 ufcs/ mL^{-1} para o controle positivo AbV5 e AbV6 (*Azospirillum brasilense*) e para o isolado R4.1 pertencente ao gênero *Sphingomonas sp* aos cinco dias após germinação. A avaliação da promoção de crescimento foi feita aos setenta dias, no estágio de floração, mediante a comparação entre o peso seco das raízes e parte aérea e altura das plantas inoculadas e dos controles.

O delineamento experimental utilizado foi o bloco casualizado com sete repetições constituindo de três vasos por repetição. Para a análise estatística utilizou-se o programa Statistix v. 9.0. A análise da variância foi realizada com 5% de significância e as médias analisadas pelo teste de Tukey em nível de 5%.

No segundo experimento, avaliou-se o acúmulo de N, onde as sementes foram peletizadas em suspensão bacteriana a 10^8 ufcs/ mL^{-1} em meio DYGS por doze (12) horas para o controle positivo AbV5 e AbV6 (*Azospirillum brasilense*) e para os isolados (R1.12) pertencente ao gênero *Herbaspirillum sp*, (R2.4) a *Pseudomonas sp*, (R3.25) a *Burkholderia sp* e (R4.1) *Sphingomonas sp*. Aos 40 dias de desenvolvimento, no estágio vegetativo, colheu-se as plantas e efetuou-se o peso fresco da parte aérea.

As folhas foram secas em estufas de circulação de ar durante 3 dias a 54°C realizando em seguida o peso seco.

A dosagem do acúmulo de N foi realizada a partir da massa seca pelo método semi-micro Kjeldhal (Tedesco et al., 1995) avaliando-se também a comparação entre o peso seco das raízes e parte aérea e altura das plantas inoculadas e dos controles.

O delineamento experimental utilizado foi bloco casualizado com três repetições constituindo seis vasos por repetição. Para a análise estatística utilizou-se o programa Statistix v. 9.0. A análise da variância foi realizada com 5% de significância e as médias analisadas pelo teste de Tukey a 5%.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

IV 1. COLETA, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS:

O processo de isolamento das bactérias foi eficiente para as amostras do híbrido Impacto (Syngenta) obtido da rizosfera de plantas de regiões diferentes.

O número de isolados rizosféricos obtidos pela metodologia adotada possibilitou a obtenção de 37, 30, 33 e 48 isolados das seguintes regiões consecutivas: Jaguariúna (SP), Passo Fundo (PR), Ponta Grossa (RS) e Vargem Grande do Sul (SP), num total de 148 isolados.

Foi detectada a presença em maior quantidade de bactérias quando o isolamento ocorreu no meio DYGS em comparação aos meios JNFB e NFB, o que pode estar relacionado principalmente devido à ausência de fonte de nitrogênio nos últimos meios citados (Tabela 1).

Tabela 1 Resultados da quantidade de isolados obtidos pelo uso dos diferentes meios de cultura da rizosfera de plantas de milho, híbrido Impacto.

Origem	Rizosfera plantas de milho (híbrido Impacto)		
	Número de isolados		
	DYGS	JNFB	NFB
1 Jaguariúna (SP)	33	0	04
2 Passo Fundo (RS)	22	08	0
3 Ponta Grossa (PR)	25	03	05
4 Vargem Grande do Sul (SP)	28	08	12
TOTAL	108	19	21

Por outro lado, os meios de cultura NFB e JNFB facilitam o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbasprillum*, respectivamente, considerando que esses meios foram desenvolvidos para o cultivo de isolados bacterianos diazotróficos de diferentes plantas, principalmente de gramíneas (KUSS et al., 2007b).

Mesmo que o meio DYGS não seja apropriado para isolamento de diazotróficos, devido à sua composição, o objetivo principal da utilização deste foi de selecionar bactérias pertencentes a outros gêneros, e também por ser um meio rico e de crescimento rápido.

Os isolados foram selecionados de acordo com as características apresentadas, cor, borda e forma, com o auxílio de uma lupa elétrica MZ-8 (Leica) obtendo-se 87

isolados diferentes, os quais foram submetidos à identificação pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA.

O método de extração do DNA utilizado foi considerado adequado e gerou material genético de boa qualidade e bom rendimento. A quantificação do DNA foi realizada pelo uso do programa Quantity One (Bio-Rad) (Figura 1), onde as concentrações foram entre 150-350 ng e os fragmentos com tamanho molecular acima de 10 Kb (dados não apresentados).

A reação de PCR foi realizada com os DNAs obtidos juntamente com os oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA, gerando fragmentos com 1500 pb, sendo adequado para o seqüenciamento (Figura 2). As seqüências obtidas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados GenBank para que pudessem ser identificadas e classificadas.

A análise pelo “Blast” demonstrou um índice de diversidade entre as bactérias que puderam ser classificadas taxonomicamente. Os resultados entre as seqüências obtidas em relação às do banco de dados apresentaram entre 92-98% de similaridade, o que indica confiabilidade para os resultados encontrados (Tabela 2).

Tabela 2: Identificação dos isolados pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Nome dos isolados	Blast	Similaridade
S1.1	<i>Pseudomonas sp</i>	93%
S1.2	<i>Pseudomonas sp</i>	95%
S1.3	<i>Bosea sp</i>	95%
S1.4	<i>Burkholderia sp</i>	93%
S1.5	<i>Azospirillum sp</i>	93%
S1.8	<i>Herbaspirillum sp</i>	92%
R1.1	<i>Flexibacter sp</i>	92%
R1.2	<i>Sphingomonas sp</i>	92%
R1.3	<i>Sphingobium sp</i>	95%
R1.4	<i>Sphingomonas sp</i>	97%
R1.6	<i>Azospirillum sp</i>	92%
R1.7	<i>Bacillus sp</i>	93%
R1.8	<i>Achromobacter sp</i>	95%
R1.10	<i>Polaromonas sp</i>	92%

R1.12	<i>Herbaspirillum sp</i>	92%
R1.13	<i>Bosea sp</i>	95%
R1.15	<i>Bosea sp</i>	93%
R1.16	<i>Azospirillum sp</i>	93%
S2.1	<i>Burkholderia sp</i>	92%
S2.3	<i>Ralstonia sp</i>	92%
S2.5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	92%
S2.6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	95%
S2.7	<i>Pseudomonas sp</i>	92%
S2.9	<i>Sphingomonas sp</i>	93%
S2.11	<i>Burkholderia sp</i>	93%
S2.13	<i>Bosea sp</i>	95%
S2.14	<i>Burkholderia sp</i>	93%
S2.15	<i>Starkeya sp</i>	93%
R2.1	<i>Burkholderia sp</i>	96%
R2.2	<i>Azospirillum sp</i>	92%
R2.3	<i>Azospirillum sp</i>	92%
R2.4	<i>Pseudomonas sp</i>	92%
R2.5	<i>Bacillus sp</i>	93%
R2.6	<i>Burkholderia sp</i>	95%
R2.7	<i>Sphingomonas sp</i>	92%
R2.8	<i>Labrys sp</i>	95%
R2.9	<i>Bosea sp</i>	92%
R2.10	<i>Labrys sp</i>	94%
R2.11	<i>Rhodoferax sp</i>	93%
R2.12	<i>Sphingomonas sp</i>	93%
R2.13	<i>Sphingobium sp</i>	92%
R2.14	<i>Herbaspirillum sp</i>	95%
R2.16	<i>Pantoea sp</i>	93%
R2.17	<i>Azospirillum sp</i>	95%
R2.18	<i>Azospirillum sp</i>	95%
R2.19	<i>Labrys sp</i>	95%
R2.20	<i>Bacillus sp</i>	93%
R2.21	<i>Bacillus sp</i>	93%
R2.22	<i>Burkholderia sp</i>	95%
R2.24	<i>Variovorax sp</i>	94%
R2.25	<i>Dyella.sp</i>	93%
R2.26	<i>Herbaspirillum sp</i>	95%
R2.27	<i>Sphingomonas sp</i>	93%
R2.28	<i>Burkholderia sp</i>	93%
R2.29	<i>Rhizobium sp</i>	93%
R2.30	<i>Burkholderia sp</i>	98%
R2.31	<i>Ralstonia sp</i>	95%
R2.32	<i>Ralstonia sp</i>	95%
R2.33	<i>Sphingomonas sp</i>	93%

R2.34	<i>Microbacterium sp</i>	92%
R2.36	<i>Labrys sp</i>	92%
S3.1	<i>Burkholderia sp</i>	93%
S3.2	<i>Burkholderia sp</i>	96%
S3.3	<i>Sphingomonas sp</i>	93%
S3.4	<i>Azospirillum sp</i>	92%
S3.7	<i>Azospirillum sp</i>	95%
R3.4	<i>Azospirillum sp</i>	92%
R3.7	<i>Herbaspirillum sp</i>	93%
R3.8	<i>Herbaspirillum sp</i>	93%
R3.9	<i>Labrys sp</i>	93%
R3.10	<i>Herbaspirillum sp</i>	92%
R3.11	<i>Pantoea sp</i>	92%
R3.12	<i>Bacillus sp</i>	95%
R3.13	<i>Azospirillum sp</i>	93%
R3.14	<i>Herbaspirillum sp</i>	92%
R3.15	<i>Herbaspirillum sp</i>	95%
R3.17	<i>Bosea sp</i>	95%
R3.21	<i>Burkholderia sp</i>	93%
R3.22	<i>Sphingomonas sp</i>	92%
R3.25	<i>Burkholderia sp</i>	99%
R3.27	<i>Herbaspirillum sp</i>	93%
R3.28	<i>Bosea sp</i>	93%
R3.31	<i>Pseudomonas sp</i>	98%
R3.33	<i>Sphingobium sp</i>	93%
R3.34	<i>Herbaspirillum sp</i>	93%
R3.35	<i>Bosea sp</i>	92%
R3.36	<i>Microbacterium sp</i>	95%
R4.1	<i>Sphingomonas sp</i>	98%
R4.2	<i>Bacillus sp</i>	93%
R4.5	<i>Ralstonia sp</i>	93%
R4.7	<i>Agrobacterium sp</i>	95%
R4.8	<i>Sphingobium sp</i>	98%
R4.9	<i>Ralstonia sp</i>	93%
R4.10	<i>Microbacterium sp</i>	92%
R4.11	<i>Azospirillum sp</i>	93%
R4.12	<i>Sphingomonas sp</i>	93%
R4.18	<i>Sphingomonas sp</i>	92%
R4.21	<i>Pantoea sp</i>	95%
R4.28	<i>Pantoea sp</i>	95%
R4.31	<i>Sphingomonas sp</i>	93%

Segundo BORNEMAN, et al (1996) a alta diversidade de microrganismos é devido a composição heterogênea do solo.

O solo constitui-se num dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e um dos mais importantes habitats para os microrganismos. Dos gêneros encontrados, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Azospirillum* foram os mais freqüentes, totalizando 65% dos isolados identificados, seguidos de *Sphingobacteria*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Pantoea* e *Bosea*.

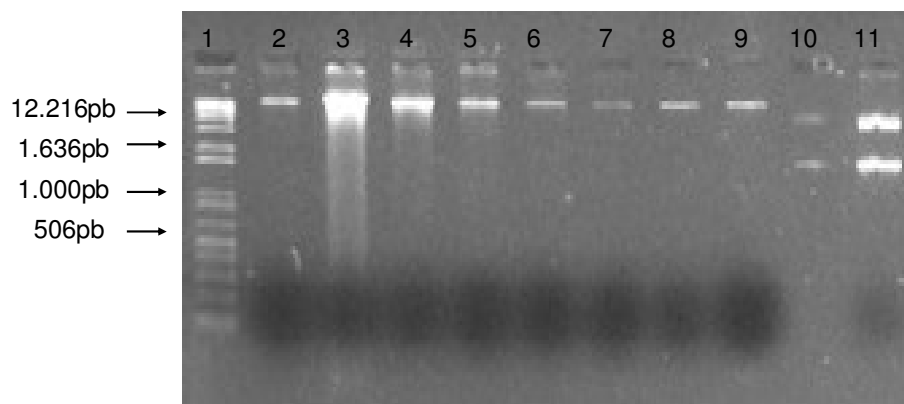


Figura 1. Perfil eletroforético da extração de alguns DNAs dos isolados selvagens obtidos de raízes de milho, híbrido Impacto, em gel de agarose 1,5% contendo Brometo de etídeo (0,5mg/μl). Canaletas: (1) padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder Gibco Molecular- No catálogo- 15615-016), (2) R4.1; (3) R3.25, (4) S2.1, (5) S2.5, (6) R4.21; (7); (8) AbV5; (9) AbV6; (10 E 11) padrão de concentração pGEM (Applied Biosystems) 100ng e 200 ng, respectivamente.

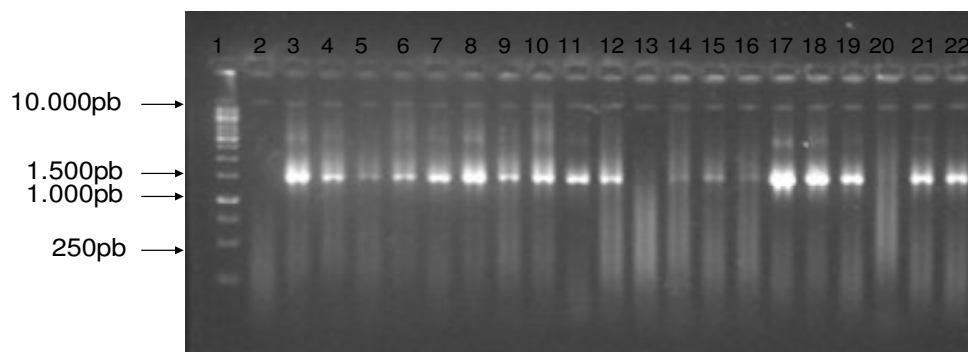


Figura 2. Perfil eletroforético de fragmentos de DNA gerados pela amplificação do DNA dos isolados bacterianos de raízes de milho, híbrido Impacto, pelo uso do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores Fd1/Rd1 em gel de Agarose 1% contendo Brometo de etídeo (0,5 mg/μl). Canaletas: (1) – Padrão de tamanho molecular (1 Kb Gene Ruler DNA Ladder - Fermentas); Canaletas (2, 13 e 20) – controles negativos; (3)R4.1; (4)R3.25; (5)S2.1; (6)S2.13; (7)S2.5; (8)S4.7; (9)R4.21; (10)R4.34; (11)R1.2; (12)R1.7; (14)R2.13; (15)R2.14; (16)R2.28; (17)R3.3; (18)R3.5; (19)R3.8; (21)R4.9; (22)R4.10, respectivamente.

MCINROY e KLOEPPER (1991) observaram que plantas saudáveis de milho contêm uma microbiota bacteriana diversificada, sendo o número de gêneros isolados do caule e da raiz maior do que o encontrado na rizosfera dessas mesmas plantas.

O predomínio dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Azospirillum* observados nesse trabalho corroboram os resultados obtidos por LALANDE (1989) que observou na rizosfera de milho uma alta porcentagem destes gêneros entre as bactérias encontradas e por BEVIVINO, et al. (1998) onde relatam que estes gêneros são comumente encontrados em tecidos internos de plantas e raízes de milho.

Os demais gêneros encontrados *Sphingobacteria*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Bosea* estão sendo isolados com certa frequência de outras plantas como mandioca e milho, com propriedades de promover o crescimento diretamente ou indiretamente da planta. (TEIXEIRA et al., 2007).

RODRÍGUEZ e FRAGA (1999) relataram que os gêneros bacterianos que mais se destacam como promotores de crescimento são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Azotobacter*, sendo que o grupo mais estudado das PGPRs pertence ao gênero *Pseudomonas*, que, além de promoverem crescimento, atuam como agentes no controle biológico de várias pragas e doenças (MISKO e GERMIDA, 2002). Essas bactérias também são fortes competidoras na rizosfera pela variedade de substâncias que podem utilizar, havendo espécies do gênero em ambientes muito variados.

Os benefícios das PGPRs podem ser observados nas mais variadas espécies vegetais como grão de bico, berinjela (KUMAR, 1998), alfafa (OLSEN e MISAGHI, 1981), beterraba (THRANE et al., 2000), rabanete (LEEMAN et al., 1995), sorgo (CHIARINI et al., 1998), batata, alface (GASONI et al., 2001; FREITAS et al., 2003); tomate (FREITAS e PIZZINATTO, 1991; HOFFMANN-HERGARTEN, 1998) e várias plantas ornamentais (YUEN e SCHROTH, 1986).

IV.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AIA PELOS ISOLADOS

Tendo em vista que o teste de um grande número de isolados em condições naturais é extremamente laborioso, este estudo foi baseado em técnicas *in vitro* para a seleção dos isolados promissores. Tais técnicas fornecem uma base para a seleção inicial de bactérias promotoras de crescimento de plantas e que podem ser usadas então para futuros testes sob condições naturais.

A análise da produção de AIA *in vitro* com os isolados foi realizada com o intuito de pré-selecionar àqueles que mais produziram o hormônio. Assim, encontrou-se que 56 destes foram positivos para o teste, quando comparados às estirpes AbV5 e AbV6 utilizadas como controle positivo. Na figura 3, observa-se alguns representantes destes isolados na avaliação da produção do AIA..

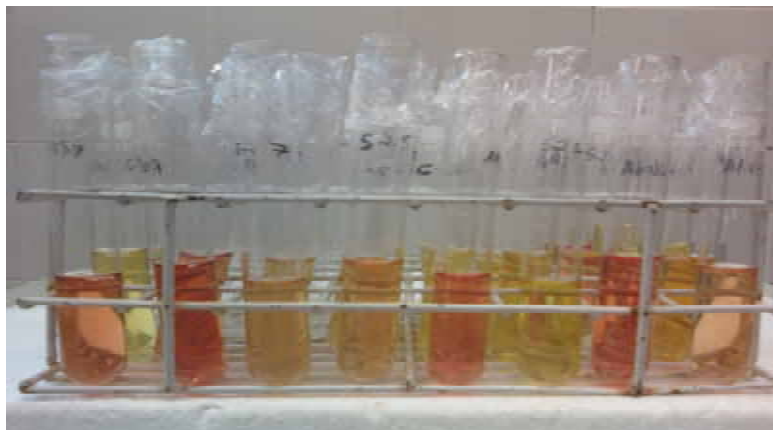


Figura 3. Teste colorimétrico da produção de AIA em meio DYGS suplementado com 100 uL/mL de triptofano realizado com reagente de Salkowsky.

Apesar deste meio de cultura possuir em sua composição extrato de levedura, fonte rica de aminoácidos, inclusive o triptofano, Yamada *et al.* (2003) relatam que a adição deste precursor promove o aumento da síntese do AIA.

Por outro lado, alguns autores sugerem que a maioria das bactérias diazotróficas, principalmente do gênero *Azospirillum* produzem o ácido indol-acético por uma via independente a do triptofano. Como o presente trabalho avaliou a produção de AIA em diferentes isolados, portanto, o triptofano foi adicionado ao meio de cultura.

A detecção da produção de AIA foi realizada a partir do sobrenadante das culturas, sendo determinadas durante um período de 12-24 horas, 24-48 horas e de 48-72 horas de crescimento bacteriano. Notou-se que 42 isolados mostravam uma produção mais elevada de AIA após às 48 horas, entretanto, observou-se variações na produção de AIA ao longo do tempo. Assim, considerou-se que somente estes 42 isolados foram positivos para dosagem de AIA pelo método colorimétrico (Tabela 3). De acordo com ONA et al. (2005) a produção de AIA só ocorre sob condições de estresse incluindo deficiência de carbono e estresse por oxigênio na fase final de crescimento das bactérias.

Tabela 3. Dosagens colorimétrica do AIA em diferentes estágios de cultivo em meio DYGS suplementado com 100 µg/mL de triptofano em DO₆₀₀, aproximada de 0,8 (12-24 hs de crescimento), 1,5 (24-48 hs de crescimento) e ≥3,5 (48-72 hs de crescimento).

Isolados	D.O. ₆₀₀ (0,8)	D.O. ₆₀₀ (1,5)	D.O. ₆₀₀ (≥3,5)
	µg AIA/mL ⁻¹	µg AIA/mL ⁻¹	µg AIA/mL ⁻¹
AbV5	8,35	42,5	68,3
AbV6	7,87	38,3	70
R1.1	9,8	22	46,9
R1.3	0	1,08	1,23
R1.4	10,7	22	53,2
R1.16	1,98	17,8	37
S1.1	6,5	24	63,5
S1.5	2,08	29,6	33
R2.2	9	17	55,2
R2.5	12,8	24,8	110
R2.6	12	26	54,1
R2.12	12	25	50,3
R2.13	17	42	102
R2.14	13,5	31,3	40
R2.16	4,39	26,5	30
R2.17	1,3	7,8	55,2
R2.22	2,88	32	38

R2.24	5.2	18.3	41.3
R2.26	2,88	32	38
R2.28	3.13	32.3	65
R2.31	10	22	66.7
R2.33	3.13	32.3	65
R2.34	4.98	27.8	97
S2.1	2.64	36.3	62
S2.3	3.22	12	82.7
S2.4	4	9.5	13.7
S2.5	9.41	21.78	98
S2.7	8.23	26	92.6
S2.13	9	36	62
R3.4	3.15	32	67
R3.8	14.7	32.4	43
R3.9	2.8	14.8	110
R3.11	6.34	13	53
R3.12	3.15	32	67
R3.13	2.65	25.27	87
R3.17	2.41	21.78	108
R3.21	2.23	68.3	104
R3.22	2.41	29	80
R3.25	1.23	18.5	31
R3.28	8.3	28	64.6
R3.34	13.8	28.3	65
R4.1	7.73	40.2	72
R4.2	22.23	68.3	104
R4.9	10	21	35.7

Verificou-se que desses isolados quatro pertencem ao gênero *Azospirillum*, três à *Herbaspirillum*, quatro à *Sphingomonas*, dois à *Pantoea*, quatro à *Burkholderia*, três à *Bacillus* e somente um isolado pertencente aos gêneros *Pseudomonas* (S2.7), *Ralstonia* (S2.3), *Microbacterium* (R2.34), *Agrobacterium* (S2.5) e *Sphingobium* (R1.3).

Os isolados pertencentes ao gênero *Azospirillum* (R1.16, S1.5, R3.4, R3.13) apresentaram dosagens diferentes de AIA entre eles e ao controle positivo (estirpes AbV5 e AbV6) nos diferentes períodos de crescimento (Tabela 3). RADWAN et al. (2004) apontam que diversas linhagens de *Azospirillum* produziram quantidades diferentes de compostos indólicos, sendo que as linhagens de *Azospirillum brasilense* mostraram níveis elevados em relação às linhagens de *Azospirillum lipoferum*.

Os isolados de *Herbaspirillum spp* (R2.14, R3.8, R3.34) produziram AIA a partir do primeiro dia de crescimento, em média $13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA na cultura, com exceção

do isolado R1.3 que apresentou níveis muito baixos de produção de AIA ($1,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA). Os microrganismos pertencentes a este gênero apresentaram dosagens semelhantes entre eles nas primeiras 24 horas de crescimento. Quando comparados ao controle positivo, nas 48-72 horas de crescimento, essas dosagens foram inferiores.

Dados apresentados por RADWAN et al (2004), relatam que as linhagens de *Herbaspirillum* demonstraram uma produção de AIA menor que as linhagens de *Azospirillum*.

Nos isolados pertencentes aos gêneros *Sphingomonas* (R2.12, R2.33, R3.22 e R4.1) e *Pantoea* (R3.11 e R2.16) as dosagens foram diferentes entre eles nos diferentes tempos de crescimento, mas em relação ao controle positivo, apenas um organismo pertencente ao gênero *Sphingomonas* (R4.1) apresentou dosagem semelhante ao controle positivo nos diferentes tempos.

O grupo das *Burkholderias* (R2.22, R2.28, S2.1 e R3.25) apresentou dosagens próximas de AIA entre elas quando avaliadas nos diferentes tempos de crescimento, mas quando comparadas ao controle positivo essas dosagens foram inferiores.

Os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* (R2.5 e R4.2) apresentaram dosagens de AIA muito superiores ao controle positivo e aos demais isolados nas 48-72 horas de crescimento. Para os demais isolados, todos foram capazes de produzir AIA em dosagens semelhantes aos isolados R2.5 e R4.2 ambos pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Devido à sua facilidade, rapidez, sensibilidade e custo, o reagente de Salkowsky têm sido amplamente empregado na detecção do AIA produzido por bactérias diazotróficas e fitopatogênicas. (STEENHOUD & VANDERLEYDEN, 2000).

Os organismos isolados neste trabalho apresentaram capacidade diferenciada na produção de AIA, conforme previamente verificado por TIEN et al. (1979) e HARTMANN et al. (1983), bem como os resultados da literatura onde apontam o teste de Salkowsky para a detecção de compostos indólicos produzidos por bactérias, entre eles, AIA (MAYER, 1958; BALOTA, et al., 1995) apresentam diferenças nas dosagens deste fitohormônio.

Tem-se verificado que o AIA excretado pelas bactérias que vivem em associação

com a rizosfera é responsável pela estimulação do crescimento e proliferação das raízes secundárias, ou pela patogênese em diversas plantas. Muitos grupos microbianos, incluindo aqueles de vida livre ou que vivem em associação com o tecido das plantas podem produzir AIA (PATTEN & GLICK, 1996).

PATTEN & GLICK (1996) relatam que alguns organismos pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter spp*, *Acinetobacter spp*, *Actinomyces spp*, *Agrobacterium spp*, *Azospirillum spp*, *Bacillus spp*, *Burkholderia spp*, *Curtobacterium spp*, *Pantoea spp*, *Pseudomonas spp* e *Xanthomonas spp* podem promover o crescimento vegetal aumentando o comprimento das raízes e o número de pêlos radiculares. TIEN et al. (1979) relataram que esse efeito é atribuído à produção microbiana de hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal.

IV.3 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO PELOS ISOLADOS

O crescimento vegetal também pode ser estimulado de forma mais direta, pelo aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas, pela solubilização de fosfato inorgânico e pela mineralização de fosfato orgânico. Diferentes gêneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Agrobacterium*, possuem habilidade para solubilizar fosfatos de compostos inorgânicos (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999).

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas. Este fato tem despertado a atenção para a utilização desses microrganismos como inoculante comercial, ou a utilização de suas populações como forma de promover uma melhor utilização do P existente no solo, ou adicionado como fertilizante (SILVA-FILHO & VIDOR, 2001).

O teste quanto à capacidade de solubilização do fosfato *in vitro* em meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL, 1999) foi realizado somente para os 42 isolados que apresentaram dosagens de AIA mais elevadas após as 48 horas de crescimento. Os halos foram medidos com 12hs, 48hs e com quinze dias de crescimento bacteriano (Tabela 4).

Tabela 4. Teste de solubilização de fosfato em meio NBRIP. Halos avaliados com 12, 48 horas de crescimento e 15 dias.

Isolados Positivos	Tempo de cultivo		
	12 horas	48 horas	15 dias
	Presença de halos	Tamanho dos halos (mm)	Tamanho dos halos (mm)
AbV5	N	N	N
AbV6	N	9	26
R1.3	N	6	16
R1.16	N	14	22
S1.5	S	8	27
R2.5	N	3	9
R2.12	S	8	13
R2.14	S	15	22
R2.16	S	7	13
R2.22	S	18	32
R2.28	S	21	32
R2.33	N	6	13
R2.34	S	8	18
S2.1	N	4	11
S2.3	S	9	17
S2.5	N	6	13
S2.7	N	12	34
R3.4	S	8	18
R3.8	S	17	27
R3.11	S	19	30
R3.13	S	15	26
R3.22	S	16	25
R3.25	S	14	24
R3.34	S	6	18
R4.1	S	9	25

R4.2

S

11

26

 *N (ausência de halo) e S (presença de halo)

Nas primeiras 12 horas de crescimento foi possível apenas verificar o início da formação ou não de halos, sem a possibilidade de medi-los. Após 48 horas, alguns isolados já apresentavam halos de solubilização do fosfato capazes de serem medidos. Contudo, após 15 dias de cultivo, o tamanho dos halos foram muito mais notáveis e variáveis para os diferentes isolados (Figura 4).

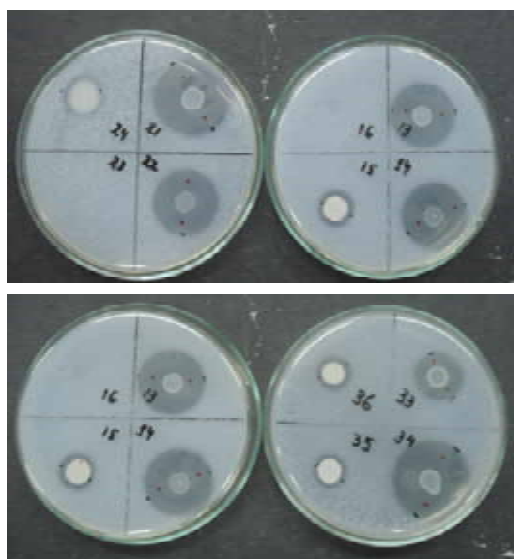


Figura 4 – Diversidade de produção de halos de solubilização de fosfato observados em meio sólido (NBRIP) pelos isolados de rizosféricos de milho, após 15 dias de cultivo.

Finalmente, os isolados positivos tanto para as provas de produção de AIA e solubilização de fosfato foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Sphingobacteria*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (Tabela 5). RODRÍGUEZ & FRAGA (1999) comprovam a capacidade desses gêneros em solubilizar fosfato inorgânico. SOUCHIE et al. (2005) relatam que o entendimento da capacidade e da eficiência de microrganismos, em solubilizar fosfatos,

pode levar à seleção de isolados com alto potencial de uso para a inoculação em plantas.

CHABOT et al. (1996 a,b) testaram microrganismos solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminosarum*, para verificar seu potencial como RPCP em alface e milho. A solubilização de fosfato por essas bactérias pareceu ser um mecanismo importante para a promoção de crescimento da planta em um solo moderadamente fértil e em outro muito fértil, por causa do aumento da disponibilidade do nutriente. Em ambos os estudos, o rizóbio mostrou-se o mais eficiente na promoção de crescimento, ainda que bactérias desse grupo sejam estudadas como fixadoras simbióticas de nitrogênio em leguminosas.

Tabela 5. Classificação taxonômica dos isolados capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato.

Nome do Isolado	Localização	Blast 16S rDNA	% (Similaridade)
1. R1.3	Jaguariúna	<i>Sphingobium sp</i>	93%
2. R1.16	Jaguariúna	<i>Azospirillum sp</i>	93%
3. S1.5	Jaguariúna	<i>Azospirillum sp</i>	93%
4. R2.5	Passo Fundo	<i>Bacillus sp</i>	92%
5. R2.12	Passo Fundo	<i>Sphingomonas sp</i>	95%
6. R2.14	Passo Fundo	<i>Herbaspirillum sp</i>	95%
7. R2.16	Passo Fundo	<i>Pantoea sp</i>	93%
8. R2.22	Passo Fundo	<i>Burkholderia sp</i>	93%
9. R2.28	Passo Fundo	<i>Burkholderia sp</i>	93%
10. R2.33	Passo Fundo	<i>Sphingomonas sp</i>	93%
11. R2.34	Passo Fundo	<i>Microbacterium sp</i>	92%
12. S2.1	Passo Fundo	<i>Burkholderia sp</i>	92%
13. S2.3	Passo Fundo	<i>Ralstonia sp</i>	92%
14. S2.5	Passo Fundo	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	92%
15. S2.7	Passo Fundo	<i>Pseudomonas sp</i>	92%
16. R3.4	Ponta Grossa	<i>Azospirillum sp</i>	92%
17. R3.8	Ponta Grossa	<i>Herbaspirillum sp</i>	93%
18. R3.11	Ponta Grossa	<i>Pantoea sp</i>	92%
19. R3.13	Ponta Grossa	<i>Azospirillum sp</i>	93%
20. R3.22	Ponta Grossa	<i>Sphingomonas sp</i>	92%
21. R3.25	Ponta Grossa	<i>Burkholderia sp</i>	95%
22. R3.34	Ponta Grossa	<i>Herbaspirillum sp</i>	93%
23. R4.1	Vargem Grande do Sul	<i>Sphingomonas sp</i>	98%
24. R4.2	Vargem Grande do Sul	<i>Bacillus sp</i>	93%

IV.4 AVALIAÇÃO DO ISOLADO R4.1 COMO RPCP EM PLÂNTULAS DE MILHO

Devido ao gênero *Sphingomonas* ter sido pouco empregado em ensaios de promoção de crescimento vegetal o isolado R4.1, pertencente a este gênero e cuja produção de AIA é equivalente ao controle positivo, foi o escolhido entre os isolados estudados para o teste de eficiência em plantas de milho na casa de vegetação. A Tabela 6 indica que a média entre os tratamentos da massa seca da parte radicular em relação a do controle positivo foram semelhantes. As raízes das plantas inoculadas com o isolado R4.1 mostraram-se mais alongadas e com pouca presença de pêlos radiculares, ao contrário do controle positivo que apresentou números elevados de raízes secundárias e pêlos radiculares.

Tabela 6 – Média dos valores da massa da parte aérea e radicular e altura de plantas de milho, inoculadas com diferentes bactérias na avaliação como PGPRs.

Tratamento	Massa seca (g)		Altura planta (cm)	
	parte aérea	raiz	20 dias	70 dias
R4.1	9,89 b	2,18 b	25,17 b	90,14 b
AbV5 e AbV6	11,50 a	2,75 a	30,71 a	98,71 a
Sem inoculo	7,47 c	1,62 c	18,57 c	86,29 c
CV	6,35	17,62	5,20	2,86

*letras diferentes representam diferenças entre as medias estatisticamente significantes

Por outro lado, observou-se uma diferença significativa em relação à altura dessas plantas quando comparada ao controle positivo. As plantas inoculadas com as estirpes de *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6) apresentaram-se mais altas e vigorosas, o que não foi observado para a planta inoculada com o isolado R4.1. Conseqüentemente, a massa seca da parte aérea da planta apresentou diferenças significativas.

Este fato indica que o isolado R4.1 identificado como pertencente ao gênero *Sphingomonas* interferiu em algum estágio de desenvolvimento da planta, podendo ser a interação entre genótipo da planta e a bactéria, adaptação às condições ambientais, tipo de solo, pH entre outros fatores.

Bactérias diazotróficas produtoras de AIA podem desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento, e no processo de enraizamento. Sabe-se que esse estímulo é dependente da dosagem do hormônio, pois o excesso dele pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (BROEK et al., 1999).

Em trigo, BALDANI & DÖBEREINER (1980) e BALDANI et al (1986) testaram diferentes estirpes de origens diversas e concluíram que estirpes isoladas da própria espécie vegetal (homólogas) foram mais eficientes do que as isoladas de plantas de outras espécies.

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por microrganismos endofíticos ainda necessita de mais estudos para um melhor entendimento dos fatores envolvidos. A interação entre o genótipo da planta e a comunidade endofítica promotora de crescimento e outros fatores podem interagir neste processo, bem como as comunidades microbianas epifíticas e da rizosfera.

Finalmente, pode-se concluir que este isolado testado (R4.1) pode ser um organismo promissor como promotor de crescimento, devido a produção de AIA e solubilização de fosfato. Contudo, para se assegurar esta capacidade, novos testes deverão ser realizados em campo e, ainda, na presença de outros genótipos de milho.

IV.5 ATIVIDADE DA REDUÇÃO DE ACETILENO A ETILENO *IN VITRO*

Os isolados que apresentaram capacidade em produzir AIA e solubilizar fosfato (Tabela 5) foram submetidos ao teste de redução do acetileno a etileno por cromatografia gasosa, para uma seleção entre os isolados a serem testados em casa de vegetação como fixadores de nitrogênio com as estirpes de *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6).

Os isolados que se destacaram nas condições experimentais *in vitro*, apresentando capacidade significativa de redução de acetileno, foram os isolados identificados como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas sp* (R2.4), *Herbaspirillum sp* (R1.12), *Burkholderia sp* (R3.25) e *Sphingomonas sp* (R4.1), o que pode sugerir que a capacidade diazotrófica destas bactérias poderia contribuir para o papel característico de promotor de crescimento em planta.

A produção de ARA ficou entre 0,1 a 0,64 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹, com 96 horas de cultivo em tubos de ensaio (Tabela 7). Desta forma, estes resultados demonstraram que estes microrganismos isolados de rizosfera de milho produziram taxas inferiores do controle positivo. Os demais isolados positivos, tanto para produção de AIA como solubilizadores de fosfato, não apresentaram a capacidade em reduzir o acetileno nesta prospecção.

A taxa de produção de etileno para as estirpes de *Azospirillum brasilenses* usadas como controle positivo, foi positiva somente para a estirpe AbV6, aumentando conforme o tempo de cultivo nos tubos de ensaio (Tabela 7). Por exemplo, nas primeiras 48 horas de cultivo a estirpe AbV6 já apresentava capacidade em reduzir o acetileno e com 96 horas de cultivo esta taxa ficou em 16,44 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹.

Os resultados positivos para atividade da nitrogenase neste trabalho foram muito abaixo dos apresentados por GOVINDARAJAN et al. (2008). Estes autores testaram atividade de ARA em duas estirpes de *Burkholderia vietnamensis* (MGK3 e TVV75) isoladas de cana-de-açúcar no Brasil e verificaram a produção de 112,94 e 241,17 nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹, respectivamente, no mesmo meio de cultura utilizado neste experimento.

A baixa taxa de atividade da nitrogenase pode ser explicada por alguns fatores. Primeiramente, os isolados utilizados neste trabalho foram purificados e cultivados por longo período em meio com fonte de nitrogênio. Neste caso, a regulação metabólica pode levar a perda da atividade enzimática, uma vez que a eficiência do processo de fixação de nitrogênio demanda muita energia do metabolismo bacteriano. Por outro lado, o teste de redução foi realizado logo após o período de isolamento das linhagens a partir da rizosfera de milho, por sucessivos repiques.

O complexo enzimático da nitrogenase depende de determinadas condições para que possa ser expresso, assim, a qualidade e a quantidade da fonte de carbono utilizada no meio de cultura podem ter sido influenciado pela ausência de atividade daquela enzima.

Gyaneshwar et al. (2001) relataram que a atividade de redução do acetileno em plântulas de arroz inoculadas com bactérias endofíticas foi dependente da adição de C ao meio de enraizamento. Balota et al. (1999) também relataram que a *Klebsiella pneumoniae* exige meio de cultura apropriado para expressar a atividade da nitrogenase. Alguns isolados podem ter perdido ou reduzido a atividade da enzima nitrogenase em consequência de repetidas repicagens em meio de cultura. As razões para isto não estão claras (Gyaneshwar et al., 2001).

O gênero *Burkholderia* tem sido apontado como de ampla ocorrência em associação com o milho cultivado no Brasil e no México (PERIN et al., 2006) sendo que a espécie *B. tropica* tem sido detectada em maior frequência. A ocorrência destes organismos em associação com o milho em diferentes regiões geográficas pode indicar que certos gêneros de bactérias diazotróficas estão associados preferencialmente ao milho independente do tipo de solo e do clima da região de cultivo.

Todos os isolados foram capazes de crescer em meio com baixo teor de nitrogênio, mas não apresentaram resultados satisfatórios de reduzir o acetileno em comparação com as estirpes padrões de *Azospirillum brasilenses*.

Tabela 7. Atividade de redução de acetileno ARA dos isolados positivos para AIA e solubilizadores de fosfato.

Estirpes	48 horas/cultivo		96 horas/cultivo	
	ARA*	D.O. ₆₀₀	ARA*	D.O. ₆₀₀
AbV5	0	0,28	0	0.94
AbV6	8.04	0.32	16.44	1.07
R1.12	0	0.48	0.25	1.5
R2.4	0	0.87	0.64	0.9
R3.25	0	0.46	0.23	1.03
R4.1	0	0.77	0.15	0.95

* Unidade de ARA nmol C₂H₄ cultura⁻¹h⁻¹

Dentre os isolados analisados, os demais positivos para AIA e solubilizador de fosfato, não foram capazes de reduzir o acetileno a etileno neste experimento.

As interações entre solo-planta-microorganismos são complexas e seus efeitos difíceis de serem interpretados, pois os mecanismos pelos quais os microrganismos podem estimular o crescimento da planta ainda são obscuros. A utilização de bactérias produtoras de AIA ou com potencial para fixação de N, é uma forma inicial de seleção de estirpes promissoras para aumento da produtividade do milho, entretanto deve-se considerar que tais características exigem condições adequadas para se expressarem (TEIXEIRA et al. 2007).

IV.6 AVALIAÇÃO DO ACÚMULO DE NITROGÊNIO POR DIFERENTES ISOLADOS EM CASA DE VEGETAÇÃO:

Os teores de N foram obtidos pela digestão por balão Kjeldahl, destilação e titulação como descrita por Bremner & Mulvaney (1982), o conteúdo de N foi determinado na parte aérea da planta.

Os 4 isolados capazes de reduzir o acetileno a etileno foram escolhidos para serem testados em casa de vegetação como fixadores de N. O acúmulo de N foi avaliado da parte aérea da planta submetida a secagem por 72 horas a 54°C.

Os resultados obtidos mostram que os isolados testados em casa de vegetação, não propiciaram algum benefício ao milho, como também demonstrado por Baldani et al. (2000) em estudo de seleção de *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de arroz.

Realmente, um dos pontos cruciais para seleção e utilização desses diazotróficos é a especificidade planta-bactéria, como também constatou Salomone & Döbereiner (1996) e Scholoter & Hartmann (1998). Reis et al. (2000), indicaram como estratégia para intensificação da seleção de bactérias diazotróficas, o uso de experimentos em condições gnotobióticas com várias bactérias e um genótipo.

Aumentos moderados, em torno de 20 %, atribuídos à inoculação com diazotróficos endofíticos, seriam considerados comercialmente significativos na agricultura moderna (Bashan & Levanony, 1990). A inoculação de bactérias diazotróficas tem-se mostrado eficiente em aumentar a atividade da nitrogenase e propiciar ganhos, principalmente no acúmulo de matéria seca, produção de grãos, concentração de N e outras características agronômicas, na maioria dos estudos. Contudo, estudos também apresentam resultados sem efeitos ou com efeitos prejudiciais.

Em geral, o efeito da inoculação sobre a produção situa-se em torno de 10 a 30 % e, em alguns casos, valores mais elevados de 50 a 250 % têm sido mencionados (Boddey & Döbereiner, 1988). Já foi demonstrado que estirpes e genótipos obtidos da mesma localidade são mais eficientes.

Baldani & Döbereiner (1980) e Baldani et al. (1986) testaram diferentes estirpes de origens diversas e concluíram que estirpes isoladas da própria espécie vegetal (homólogas) foram mais eficientes do que as isoladas de plantas de outras espécies.

Os promotores de crescimento repassam o nitrogênio reduzido para planta, dependendo do genótipo do vegetal ou dos procedimentos adotados no experimento, sendo o fator ambiental como temperatura, clima e solo fundamentais para o sucesso do experimento. Desta forma, não apenas a quantidade de nitrogênio assimilado por

estes microrganismos e disponibilizado para as plantas, mas, também, diversos fatores abióticos podem influenciar nesta interação e, portanto, no efeito positivo no desenvolvimento da planta.

V. CONCLUSÃO:

1. A análise das seqüências do fragmento 16SrDNA identificou e diferenciou os isolados em 18 gêneros.
2. Os isolados R1.12, R2.4, R3.25 e R4.1 foram caracterizados como ótimos produtores de AIA e solubilizadores de fosfato.
3. Os isolados não apresentaram efeito benéfico para o nitrogênio, nas condições analisadas, contrário aos efeitos observados *in vitro*.
4. Teste em casa de vegetação mostrou que os isolados citados acima interferiram positivamente em algum estágio de desenvolvimento da planta.
5. 60% dos isolados selvagens obtidos por este trabalho foram capazes de produzir AIA "*in vitro*".

VI REFERÊNCIAS:

ABEL, S; OELLER, P.W.; THEOLOGIS, A. Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 91: 326– 330. 1994.

AGUILAR, J.M.M.; ASHBY, A.M.; RICHARDS, A.J.M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M.D. SHAW, C.H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology, Reading**, v.134, p.2741-2746, 1988.

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

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodeversity. In: ATLAS, M.; AUONCKELEN. *Azospirillum brasiliense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a nontryptophan dependent pathway. **Molecular. Plant-Microbe Interact.** v.6, p.609-615, 1993.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996a.

BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in infection of cereal with *Azospirillum* spp. **Soil Biology Biochemistry.**, 12:433-440, 1980.

BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant Soil**, 90:35-46, 1986.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum*: spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin. v.4, p.57-60, 1987

BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.35-45, 1986a

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Bulkholderia* spp. **Biology Fertil. Soils**, 30:485-491, 2000.

BARTEL, B; FINK, G.R. Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 91:6649–6653. 1994.

BARTEL, B; LECLERE, S.; MAGIDIN, M.; ZOLMAN, B.K.. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β oxidation. **Journal of Plant Growth Regulation** v.20, p.198–216, 2001.

BARTHA, R. **Microbial ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1008. P.27-57.

BALOTA, R. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1265-1276, 1999.

BELIMOV, A.A.; KOJEMIAKOV, A.P.; CHUVARLIYEVA, C.V. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v.173, p.29-37, 1995.

Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. Sao Paulo: FAPESP, 1997. P.1-13.

BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ^{15}N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in the field. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.924-929, 1983.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.195-209, 1995.

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N -labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**. Dordrecht, v.90, p.265-292, 1986.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n. 6, p.935-43, 1996.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 7, p. 2647-53, 1997.

Bradyrhizobium japonicum in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1705-1710, 1991.

BROEK, A.V. Auxins upregulate expression of the indole-3-Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p.1338-1342, 1999.

BURG, S.P.; BURG, E.A. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 55: 262–269, 1966.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 243-253, 1992.

CANHOS, V.P. et al. Diversidade no domínio bacteria. In: CANHOS, V.P. et al. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1997. P.1-13.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2767-2772, 1996b.

CHEN, W.X.; WANG, E.T.; LI, Y.B.; LI, Y.; GAO, J.L. *Rhizobium bairdianensis*, a new species of root nodule bacteria isolated from tropical region. In: *International Symposium on Diversity and Taxonomy of Rhizobia*, Wuhan, China, p.16, 1994.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p. 81-87, 1997.

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

CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, n 8/9, p. 983-993, 1998.

DA RÓZ, A.L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. **Polímeros**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 4-6, 2003.

DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. Okon, Y., ed. *Azospirillum / plant associations*. Boca Raton: CRC Press, p.57-75, 1994.

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

DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.9, p.119-123, 1977.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, n.2, p. 107-149, 2003

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.1, p.357-365, 1966.

DÖBEREINER, J. Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative N_2 - fixing organisms. Graham, P.H.; Harris, S.C., ed. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p.469-483, 1982.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J.B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 173-179.

DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, Jena, v.124, p.224-230, 1970.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959a.

DÖBEREINER, J., DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. Newton, W.E.; Nyman, C.J., ed. Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation. Pullman: Washington State University Press, p.518-538, 1976.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959b.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I. et. al., ed. *Azospirillum* VI and related Microorganisms. Berlin: Springer-Verlag, p.3-14, 1995b.

DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. Stewart D.P.; Gallon, J.R., ed. Nitrogen fixation. London: Academic Press, p.301-334, 1980.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Madison: Science Tech Publishers, 154p, 1987.

DOJKA, M.A. Microbial diversity in a Hydrocarbon-and chlorinated solventcontaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p. 3869-3877, 1998.

DOLEZAL K, SANDBERG G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 101: 8039–8044. . 2004.

DROZDOWICZ, A. Bacterias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados** .Planaltina: Embrapa/CPAC, 1997. p. 17-66.

DUARTE, A. P. Característica e sistemas de produção. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 109-139.

Ecologia Microbiana. Jaguariuna: Embrapa/CNPMA, 1998. p. 187-204.

EKLÖF, S.; ÅSTOT, C.; SITBON, F.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDBERG; G. Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium* iaa and ipt genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. *Plant Journal* 23: 279–284, 2000.

EPSTEIN, E.; LAVEE, S. Conversion of indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid in cuttings of grapevine (*Vitis vinifera*) and olive (*Olea europaea*). **Plant Cell Physiology** v.25, p.697-703, 1984.

EPSTEIN, E.; LUDWIG-MUEER, J. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport **Physiology Plant** v.88, p.382-389, 1993.

FAGERIA, N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas**. Brasília, DF: EMBRAPA-DPU, 1989. 245 p. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 18).

FALLIK, J.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 511-515, 1996.

FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

FENG, L.; ROUGHLEY, R.J.; COPELAND, L. Morphological Changes of Rhizobia in Peat Cultures. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1064-1070, 2002.

FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate-reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.4, p.47-53, 1987.

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

FREITAS, J.L.M.; PEREIRA, P.A.A.; DOBEREINER, J. Effect of organic matter and *Azospirillum spp.* strains in the metabolism of nitrogen in *Sorghum vulgare*. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P., ed. Associative N₂ fixation. Boca Raton: CRC Press, v.1, p.155-163, 1981.

FU, X.; HARBERD, N.P. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. **Nature** v.421:d40–743. 2003.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E. G.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 23, p. 249-256, 1996.

GHAJ, S. K.; THOMAS, G. V. Occurrence of *Azospirillum spp.* in coconut-based farming systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 114, p. 235-241, 1989.

FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n.1, p. 61-70, 2003.

FREITAS, S.S.; PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas sp.* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v. 17, n. 2, p. 105-112, 1991

GARCIA DE SALAMONE, I.E. Influencia de bacterias del genero *Azospirillum* sobre el rendimiento y nutricion nitrogenada del cultivo de maiz (*Zea mays L.*). Buenos Aires. Universidade de Buenos Aires. 172p 1993.

GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOSSEN, V.; ZUMELZU, G.; BABBITT, S.; KAHN, N. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 108, p. 530-535, 2001.

GILLIS, M.; KERTERS, B.; HOSTE, D.J.; KROOPPENSTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobaeter diazotrophicus* sp. nv. A nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.39, p.361-364, 1989.

GOVINDARAJAN, M. et al. Effects oh the inoculation oh Burkholderia vietmanensis and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, v.55, p. 21-37, 2008

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

HARTMANN, A.; ASSMUS, B.; CHATZIMOTAS, A.; SCHLOTER, M.; LUDWIG, W.; KIRCHHOF, G. Use of molecular probes to study Azospirillum-plant interactions. In: International Workshop on Associative Interactions of Nitrogen-Fixing Bacteria with Plants. Saratov, Russia, p.59-63, 1995.

HENTSCHEL, U. et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.09, p. 4431-4440, 2002.

HILL, N.M.; PATRIQUIN, D.G. Maximizing N₂ fixation in sugarcane litter. p.59-60. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.

HOFFMANN-HERGARTEN, S.; GULATI, M.K.; SIKORA, R.A. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 105, n. 4, p. 349-358, 1998.

HUBBELL, D.H.; MORALES, V.M.; UMALI-GARCIA, M. Pectolytic enzymes in Rhizobium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v.35, p.210-213, 1978.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e Isolamento de Rizóbios. In: Araújo, R.S. (Eds). Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. 1 .ed. Brasília: Embrapa - SPI, 1994. cap. 2, p. 45-62.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS (GCEA/IBGE, DPE, COAGRO). **Levantamento sistemático da Produção Agrícola outubro de 2005**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 dez. 2006.

KAMEN, M.D. Discoveries in nitrogen fixation. **Science**. v.188, p.38-42, 1953.

KAMEN, M.D., and H. Gest.. Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Science** v.109, p.560, 1949.

KAVIMANDAN, S.K; SUBBA-RAO, N.S.; MOHRIR, A.V. Isolation of *Spirillum lipoferum* from the stems of wheat and nitrogen fixation in enrichment cultures. **Current Sciences**, Middletown, v.47, p.96-98, 1978.

KAPE, R.; PARNISKE, M.; WERNER, D. Chemotaxis and nod gene activity of KAVIMANDAN, S.K; SUBBA-RAO, N.S.; MOHRIR, A.V. Isolation of *Spirillum lipoferum* from the stems of wheat and nitrogen fixation in enrichment cultures. **Current Sciences**, Middletown, v.47, p.96-98, 1978.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited?. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.56, p. 211-236, 2002.

KHAMMAS, K.M.; AGERON, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sr. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v.140, p.679-693, 1989.

KÖGL, F.; SMIT, A.J.. Über die Chemie des Wuchsstoffs. K. Akad. Wetenschap Amsterdam Proceedings. Section Science 34: 1411–1416, 1931.

KUMAR, B.S.D. Disease suppression and crop improvement through *fluorescens* pseudomonads isolated from cultivated soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 735-741, 1998.

KUSKE, C. R. et al. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.09, p. 3614-3621,1997.

KUSS, A.V. et al. Fixação de nitrogênio e producao de acido indol-acético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasilia, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007b.

LEEMAN, S.; VAN PELT, J. A.; DEN OUDEN, F.M.; HEINSBROEK, M.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHPPERS, B. Induction of systemic resistance against *Fusarium wilt* of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v. 85, p. 1021-1027, 1995.

LOPER, J. E.; SCHROTH, M.N. Influence of bacterial sources of indol-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p.386-389, 1986.

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

LUDWIG, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.153, n.1, p. 181-90, 1997.

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32: 219–230, 2000.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, Sao Paulo, v.31, p. 77-82, 2000.

MADHAIYAN, M.; SARAVANAN, V.S.; JOVI, D.B.; LEE, H.; THENMOZHI, R.; HARI, K.; SA, T. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiology Res*;v.159(3), p.233-43. 2004.

MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Biologia**. Rio de Janeiro, v.39, p. 587-596, 1979.

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*. 66(11):1296-1311, 2005.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGÓVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. de O.; RIBEIRO JR., W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. Use of *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains indigenous from Brazilian "Cerrado" region. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics; - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p.162-163, 1996.

microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, no 8/9, p. 983-993, 1998.

MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, RM. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ^{15}N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.657-663, 1990.

MOREIRA, F.M.S.; GILLIS M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total protein. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p.135-146, 1993

MORGAN, P.W. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of ethylene by cotton and grain sorghum. **Physiologia Plantarum** v.15, p.420–427, 1962.

MÜLLER, A.; WEILER, E.W. IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biology and Chemistry** v.381, p. 679-686, 2000a.

MÜLLER, A.; WEILER, E.W. Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** v.211, p 855-863, 2000b.

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

NEVES, M.C.P.; DIDONET, A. D.; DUQUE, F.F.; DOBEREINER, J. Rhizobium strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.22, p.1179-1192, 1985.

NORDSTRÖM A, TARKOWSKI P, TARKOWSKA D, NORBAEK R, ÅSTOT C, DOLEZAL K, SANDBERG G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 101: 8039–8044. . 2004.

NORDSTRÖM A, TARKOWSKI P, TARKOWSKA D, NORBAEK R, ÅSTOT C, NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. **The ecology of tropical food crops** . 2. ed. Melbourne: Cambridge University Press, 1995 430p.

NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. **The ecology of tropical food crops** . 2. ed. Melbourne: Cambridge University Press, 1995. 430 p.

OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. **Trends In Biotechnology**, Amsterdam, v.3. p.223-228, 1985.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**. Dordrecht v.90, p.3-16, 1986.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum* : an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

OKON, Y.; BURDMAN, S.; KIGEL, J.; ITZIGSOHN, R. Physiological properties of *Azospirillum brasilense* and its growth promoting effects in the rhizosphere. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, p.55-56, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB: p.65-66, 1995. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 1996.

OLSEN, N.W.; MISAGHI, I.J. Plant growth promoting activity of heat-killed cells of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, Sant. Paul, v. 71, p. 1006, 1981.

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 1, p. 125-132, 2005.

PAREDES-CARDONA, E.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M.; CABALLERO-MELLADO, J. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 30, p. 351-355, 1988.

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

PERIN, L. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103 - 3110, 2006.

PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 2101-2103, 2001.

POUPART, J.; WADDELL, C.S. The rib1 mutant is resistant to indole-3-butyric acid, an endogenous auxin in Arabidopsis. **Plant Physiology** v.124, p.1739–1751. 2000.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHELS, K.; VANDERLEYDEN, J. and H. RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.665-693, 1999.

RAO, N.S.S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 863-866, 1983

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; REIS JÚNIOR, F.B.; REIS, V.M. & TEIXEIRA, K.R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria spp.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília v .41, n .3, 2006.

REINHOLD, B.; HUREK, T. *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.), and description of two species *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.43, p.574-584, 1993.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.43-51, 1987.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L. & DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Crit. Rev. Plant Sci.**, 19:227-247, 2000.

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

RELARE, Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola, Protocolo para Análise de Inoculantes, Estirpes e outras Tecnologias Relacionadas ao Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em Plantas não Leguminosas, **X RELARE**, maio de 2004.

RHIZOBIA, Proceeding. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press., p. 3-10, 1996.

RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 829-836, 2001.

- ROCHA, R.E.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Specificity of infection by *Azospirillum* spp. in plant with C4 photosynthetic pathway. Associative N₂ fixation. Boca Raton. P67-69, 1981.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.
- ROPER, M.M.; LADHA, J.K. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.211-224, 1995.
- ROSATO, A.S.; WOLTERS, A.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Quantitative analysis of *Paenibacillus azotofixans* in soil and rhizosphere of wheat using MPN-PCR. In: International Symposium on Sustainable Agriculture of the Tropics - The Role Of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, p.228-229, 1995.
- ROSS, J.J.; O'NEILL, D.P.; SMITH, J.J.; KERCKHOFFS, L.H.J.; ELLIOTT, R.C. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **Plant Journal**, v.21, p.547-552, 2000.
- ROUGHLEY, R.J. Some factors influencing the growth and survival of the root nodule bacteria in peat culture. **Journal Applied. Bacteriology**, v. 31, p. 259-265, 1968.
- SALOMONE, I.G. & DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biol. Fertil. Soils**, 21:193-196, 1996.
- SANDAA, R.A. et al. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, n. 2, p. 265-268, 1998.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p.261-269, 1995.
- SEGÓVIA, L.; YOUNG, J.P.W., MARTÍNEZ-ROMERO, E.. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaesoli* type I as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.374, 1993.
- SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.451-456, 1984.
- SILVA, A.S.; PESSOA, M. C.P.Y.; FERRACINI, V.L.; CHAIM, A.; SILVA, C.M.M. de S.; HERMES, L.C. Produção integrada de frutas – o que é? **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, p. 5-14, 2001.

SILVERSTONE, A.L.; JUNG, H.S.; DILL, A.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; SUN, T.P. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** v.13, p.1555–1565, 2001.

SITBON, F.; PERROT-RECHENMAMM, C. Expression of auxin-regulated genes. **Physiology Plant** v.100, p.443-455, 1997.

SKOOG, F.; MOLEIRO, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* v.11, p.118–131. 1957.

SCHOLOTER, M. & HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, 25:159-179, 1998.

SOTO-URZUA, L.; XOCHINUA-CORONA, Y.G.; FLORES-ENCARNACION, M.; BACA, B.E. Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferases from *Azospirillum brasilense* UAP 14 strain. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p.294-298, 1996.

SOUZA, M. L. de. Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, n. 21, p. 28-31, 2001.

SPRENT, J.; FARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. In: SKINNER, F.A.; BODDEY, R.M.; FENDRINK, K.L. ed. *Nitrogen fixation with nonlegumes*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p.3-11, 1989.

STEIBORN, J.; ROUGHLEY, R.J. Toxicity of sodium and chloride ions to *Rhizobium* spp. In broth and peat culture. **The Journal of Applied Bacteriology**. v.39, n.2, p.133-138, 1975.

SUTTLE, J.C. Effect of ethylene treatment on polar IAA transport, net IAA uptake and specific binding of N-1-naphthylphthalamic acid in tissues and microsomes isolated from etiolated pea epicotyls. **Plant Physiology** v.88, p.795–799, 1988.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Assimilação de Nutrientes. In: TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a edição. Porto Alegre-RS, ed. Artmed, p. 286-298, 2004.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum* lipoferum group, with description of a new genus. *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v.8, p.967-980, 1978.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TEIXEIRA M.A. et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietais em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1 p. 43-49, 2007.

THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.43-51, 1987.

THIMANN, K.V. Hormone action in the whole life of plants. Amherst: University of Massachusetts Press. 1977.

THRANE, C.; NIELSEN, T.H.; NIELSEN, M.N.; SORENSEN, J.; OLSSON, S. Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, p. 139-146, 2000.

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

TOLLENAAR, M.; DWYER, L. M. Physiology of maize. In: SMITH, D. L.; HAMEL, C.(Ed.). **Crop yield, physiology and processes**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. cap. 5. p.169-201.

TRAN VAN, V.; GILLIS, M. Isolation from the rice rhizosphere of a new nitrogen fixing Proteobacteria, belonging to the genus Burkholderia. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M., ed. Nitrogen fixation with non-legumes. Cairo: American University in Cairo Press, p.299-309, 1994.

TRINICK, M.J.; HADOBAS, T.A. The biology of the Parasponia-Bradyrhizobium symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.37, p.177-185, 1988.

TSUNECHIRO, A.; DUARTE, A. P.; OKAWA, H. Custo operacional da cultura de milho, por região e época, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 53-60, 1995.

VALADARES-INGLIS, M.C.; MELO, I. S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. APP, A.A.; WATANABE, I.; VENTURA, T.S.; BRAVO M.; JUREY, C.D. The effect of cultivated

and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil. **Soil Science**, Baltimore, v.141, p.448-452, 1986.

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

WATANABE, I.; BARRAQUIO, W.L. Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N_2 -fixing organisms from rice roots. **Nature**, London, v.277, p. 565-566, 1979.

WEBER, O.B.; CRUZ, L.M.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 201-205, 2001.

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p. 103-113, 1999.

WEBER, O.B. Ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em bananeiras (*Musa spp.*) e abacaxizeiros (*Ananas comosus (L) Merrill*) e seus efeitos no crescimento de mudas micropropagadas. 1998. 192 p. Tese (Doutorado) -UFRRJ, Seropédica, RJ, 1998.

WILLIAMS, L.E. & MILLER, A.J. Transporters responsables for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**. V. 52, p. 659-688, 2001.

Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n. 6, p. 935-43, 1996.

WOLBANG, C.M.; CHANDLER, P.M.; SMITH, J.J.; ROSS, J.J. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. **Plant Physiology**, v.134, p.769–776, 2004

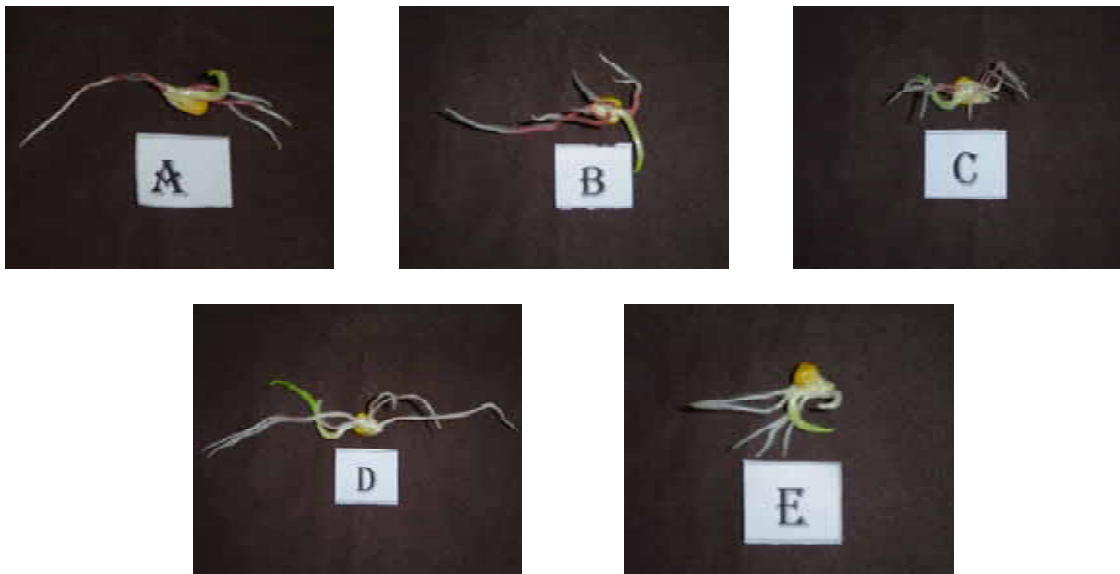
YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C.; SGARBIERI, V.C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v.16, p.423-432, 2003.

YABBUCHI, E.; KOSAKO, Y. Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) com. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.

YOUNG, J.P.W. Taxonomy of rhizobia. In: DIVERSITY AND TAXONOMY OF ZAPATA, F.; AMANN, H. ^{32}P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. **Fertilizer Research**, v.41, p.189-195, 1995.

YUEN, G.Y.; SCHROTH, M.N. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 176-180, 1986.

APÊNDICE I: Diferenças entre raízes em sementes inoculadas com 10^8 ufc/mL⁻¹ com os isolados R4.1, R2.4, R3.25 e estirpes padrões AbV5/Abv6 germinadas em papel-filtro.



Figuras: (A) representa o isolado R4.1 (*Sphingomonas sp*), (B) isolado R2.4 (*Pseudomonas sp*), (C) controle negativo, (D) controle positivo - estirpes AbV5/AbV6 (*Azospirillum brasilense*) e (E) isolado R3.25 (*Burkholderia sp*).

APÊNDICE II: Meios de cultura utilizados

1. MEIO DYGS:

Glicose	2g
Peptona	1,5g
Extrato de Levedura	2,0g
KH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	0,5
Acido Glutamico	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 6.8

Meio solido colocar a quantidade 9g/L de agar bacteriano

2. MEIO NFB:

Acido Málico	5g
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N de KOH 2mL	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
FeEDTA	0,61g
K ₂ HPO ₄	0,5g
KOH	4,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g

Solução de Micronutrientes	2mL
Solução de vitaminas	1mL

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 5.8

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

3. MEIO JNFB:

Ácido Málico	5g
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N de KOH	2mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
FeEDTA	0,61g
K ₂ HPO ₄	0,5g
KOH	4,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g

Solução de Micronutrientes	2mL
Solução de vitaminas	1mL
KH ₂ PO ₄	1,8g
Extrato de Levedura	0,2g

Completar para 1000mL com H₂O destilada

Ajustar o pH 5.8

Meio sólido colocar a quantidade 9g/L de ágar bacteriano

Micronutrientes para meios de cultura (NFB e JNFB)

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,200g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,235g
H ₃ BO ₃	0,280g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,008g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024g

Completar o volume para 200mL com água destilada.

Vitamina para os meios de cultura (NFB e JNFB)

Biotina	10mg
Pyroridoxol	20mg
H ₂ O	100mL

Dissolver em banho-maria (40° C)