

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS EPÍFITAS E ENDOFÍTICAS
DA CULTURA DO MILHO**

Rafael de Mello Milani

Biólogo

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS EPÍFITAS E ENDOFÍTICAS
DA CULTURA DO MILHO**

Rafael de Mello Milani

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Microbiologia Agropecuária.

2017

Milani, Rafael de Mello
M637d Diversidade de bactérias epífitas e endofítica da cultura do milho /
Rafael de Mello Milani. - - Jaboticabal, 2017
vii, 44 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Everlon Cid Rigobelo
Banca examinadora: Leonardo Lucas Madaleno, Fábio Camilotti
Bibliografia

1. Promotoras de crescimento. 2. AIA. 3. Solubilização de fósforo.
4. Nitrogênio. 5. PCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:633.15

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

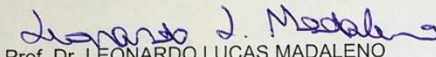
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS EPÍFITAS E ENDOFÍTICAS DA CULTURA DO MILHO

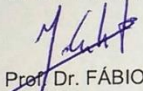
AUTOR: RAFAEL DE MELLO MILANI

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP


Prof. Dr. FÁBIO CAMILOTTI
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 30 de junho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAEL DE MELLO MILANI – nascido em 05 de maio de 1988, na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo, filho de Agnaldo Roberto Milani e Maria José Ferreira de Mello Milani, biólogo graduado pelo Centro Universitário Barão de Mauá em dezembro de 2010. Ingressou no curso de pós-graduação em nível de mestrado em março de 2014, no programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Câmpus de Jaboticabal, fazendo parte da equipe do Laboratório de Microbiologia do Solo – LSM.

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121 "Todos os seus sonhos podem se tornar realidade se você tem coragem para
122 persegui-los" – Walt Disney

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143 A Deus por ser a Luz que me guia por todos os caminhos, a Nossa Senhora
144 Aparecida por sua valorosa intercessão. Também à minha família e avós, pelo apoio
145 e auxílio irrestrito e a Letícia pelo companheirismo, compreensão, paciência e
146 suporte fornecidos.

147

Dedico

149 **A Deus** que guiou todos meus passos, me dando suporte, coragem e determinação
150 em todos os momentos da minha jornada.

151 **A Nossa Senhora Aparecida** por sua intercessão, a quem recorro sempre para
152 falar por mim junto a Deus Pai e a Seu Filho Jesus Cristo, Deus Filho, e que nunca
153 me faltou em momento algum.

154 **A Letícia do Nascimento** por caminhar comigo, me incentivar, escutar e pela
155 paciência concedida.

156 **Aos meus pais** Agnaldo Roberto Milani e Maria José Ferreira de Mello Milani que
157 nunca me deixaram desistir de perseguir meus sonhos.

158 **Aos meus irmãos** Ramon de Mello Milani e Renan de Mello Milani que sempre
159 estiveram presentes nos momentos de necessidade e compartilharam comigo todas
160 as alegrias.

161 **A toda minha família** em especial aos meus **avós** Elsio Milani e Maria Neide
162 Barbieri Milani, que me acolheram e não deixaram nada faltar, dando todo o apoio e
163 suporte que precisava.

164 **À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal** pela
165 oportunidade de realizar o curso.

166 **Ao Professor Doutor Everlon Cid Rigobelo**, meu orientador pela paciência,
167 aprendizagem e por construir um trabalho em conjunto, ensinando e caminhando
168 lado a lado no desenvolvimento do projeto.

169 Ao técnico do Laboratório de Microbiologia do Solos (LSM), **Luiz Carlos de Assis**,
170 pela determinação, paciência, sabedoria, competência e companheirismo.

171 **A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e ao
172 **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).**

173 **A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).**

174 Aos membros da banca examinadora **Dr. Leonardo Lucas Madaleno e Dr. Fábio**
175 **Camilotti.**

176 **Aos colegas:** Marcelo Barbosa, Fernanda Nascimento, Roberta Mendes dos
177 Santos, Dinalva Mochi, Ana Carolina Machado, Noemi Carla Baron Cozentino,
178 Laiana Lana, Paola Escobar e Mariana Monezi Borzi, pelos conhecimentos
179 compartilhados, por estarem presentes e solícitos.

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

SUMÁRIO

199

200

Página

201	RESUMO.....	iii
202	ABSTRACT.....	iv
203	LISTA DE TABELAS.....	v
204	LISTA DE FIGURAS.....	vi
205	1. INTRODUÇÃO.....	1
206	2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
207	2.1. Microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCP).....	3
208	2.1.1. Benefícios indiretos dos MPCP.....	3
209	2.1.1.2. Antagonismo.....	3
210	2.1.1.3. Indução no sistema de resposta da planta.....	4
211	2.1.1.4. Interferência no sistema “ <i>quorum sensing</i> ”.....	4
212	2.1.1.5. Risorremediação.....	4
213	2.1.2. Benefícios diretos dos MPCP.....	5
214	2.1.2.1. Fixação do nitrogênio.....	5
215	2.1.2.2. Solubilização de fósforo.....	7
216	2.1.2.3. Produção de fitohormônios.....	9
217	2.2. Bactérias epífitas e endofíticas.....	11
218	2.3. Milho.....	12
219	3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
220	3.1. Processamento da amostra e isolamento das bactérias epífitas e	
221	endofíticas cultiváveis.....	15
222	3.2. Seleção das bactérias epífitas e endofíticas solubilizadoras do fósforo.....	16
223	3.3. Seleção das bactérias epífitas e endofíticas fixadoras de nitrogênio.....	17
224	3.4. Seleção das bactérias epífitas e endofíticas produtoras de AIA.....	17
225	3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação, sequenciamento e	
226	análise da região 16S rDNA bacteriano.....	18
227	4. Resultados.....	19

228	5. Discussão.....	28
229	6. Conclusão.....	32
230	7. Agradecimentos.....	32
231	8. Referências.....	32
232		
233		
234		
235		
236		
237		
238		
239		
240		
241		
242		
243		
244		
245		
246		
247		
248		
249		
250		
251		
252		

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS EPÍFITAS E ENDOFÍTICAS DA CULTURA DO MILHO

RESUMO - Bactérias que habitam os tecidos externos e internos de plantas sem lhes causarem prejuízos são conhecidas como epífitas e endofíticas, atuando como promotoras de crescimento em plantas ou agindo como agentes de controle biológico. Dentre os benefícios proporcionados por essas bactérias, destacam-se a solubilização do fósforo, a fixação do nitrogênio e a produção de ácido indol acético (fitohormônio), mas também a resistência a patógenos e a adaptação a situações de estresse. Os desafios da agricultura moderna e a importância da cultura do milho exigem inovações como o uso de microrganismos promotores de crescimento. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi de isolar e caracterizar bactérias epífitas e endofíticas obtidas da cultura do milho com capacidade solubilizar fósforo, fixar nitrogênio e produzir ácido indol acético. O isolamento resultou em 320 isolados retirados das folhas, caules e raízes, sendo 57% epífitas e 43% endofíticas. Foram selecionados 10 isolados, todas solubilizadoras de fósforo e fixadoras de nitrogênio, além de produtoras de ácido indol acético, que também foi quantificado e comparadas ao controle positivo. Os microrganismos selecionados foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise da porção 16S do rDNA, sendo que a identificação resultou em três espécies bacterianas diferentes, 8 *Bacillus subtilis*, 1 *Bacillus velezensis* e 1 *Lactococcus lactis*, encontradas nos diferentes órgãos vegetais.

Palavras – Chave: AIA, nitrogênio, PCR, promotoras de crescimento, solubilização de fósforo.

DIVERSITY OF EPIPHYTIC AND ENDOPHYTIC BACTERIA FROM CORN

ABSTRACT - Bacteria that inhabit the external and internal tissues of plants without damaging them are known as epiphytes and endophytes, acting as growth promoters in plants or acting as biological control agents. Among the benefits provided by these bacteria, phosphorus solubilization, nitrogen fixation and the production of indole acetic acid (phytohormone), as well as resistance to pathogens and adaptation to stress situations are noteworthy. The challenges of modern agriculture and the importance of maize culture require innovations as the use of plant growth microorganisms, in this way the present study had as aim to isolate and characterize the epiphytic and endophytic bacteria obtained from maize culture with the ability to solubilize phosphorus, fix nitrogen and produce indole acetic acid. Isolation resulted in 320 isolates from leaves, stems, and roots, being 57% epiphytic and 43% endophytic. Ten isolates, all phosphorus solubilizers, and nitrogen fixers were selected, as well as indole acetic acid producers, which were also quantified and compared to the positive control. The selected microorganisms were submitted to polymerase chain reaction (PCR) and analysis of the 16S portion of rDNA, and the identification resulted in three different bacterial species, 8 *Bacillus subtilis*, 1 *Bacillus velezensis* and 1 *Lactococcus lactis*, found in the different plant organs.

Keywords: AIA, nitrogen, PCR, growth promoters, phosphorus solubilization.

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Produção total de grãos no Brasil durante as safras 2015/2016 e 2016/2017 e comparação entre ambas às safras.....	14
Tabela 2. nº de isolados bacterianos epífitas no milho, em função do local de colonização e característica na promoção de crescimento da planta.....	20
Tabela 3. nº de isolados bacterianos endofíticos no milho, em função do local de colonização e característica na promoção de crescimento da planta.....	20
Tabela 4. Quantidade de AIA produzida pelos isolados com no mínimo 50% de produção em relação ao <i>Azospirillum</i>	21
Tabela 5. Identificação dos isolados solubilizadores de P, fixadores de N e melhores produtores de AIA e órgão vegetal colonizado.....	21

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Gráfico da curva padrão encontrado para as leituras em duplicata das diferentes concentrações de AIA, após leitura em espectrofotômetro.....	18
Figura 2. Árvore filogenética baseada na comparação de nucleotídeos de sequências já conhecidas com as sequências obtidas de isolados da planta do milho.....	22
Figura 3. Árvore filogenética do isolado 188, alinhado à espécie de <i>Bacillus velezensis</i> , após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....	23
Figura 4. Árvore filogenética do isolado 274, alinhado à espécie de <i>Lactococcus lactis</i> , após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....	24
Figura 5. Árvore filogenética do isolado 291, alinhado à espécie de <i>Bacillus subtilis</i> , após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....	24
Figura 6. Árvore filogenética do isolado 248, alinhado à espécie de <i>Bacillus subtilis</i> , após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....	25
Figura 7. Árvore filogenética do isolado 263, alinhado à espécie de <i>Bacillus subtilis</i> , após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....	25
Figura 8. Árvore filogenética do isolado 274, alinhado à espécie de <i>Bacillus subtilis</i> , após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....	26

Figura 9. Árvore filogenética do isolado 309, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....26

Figura 10. Árvore filogenética do isolado 290, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....27

Figura 11. Árvore filogenética do isolado 287, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....27

Figura 12. Árvore filogenética do isolado 287, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.....28

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

1. INTRODUÇÃO

O milho é uma das culturas mais importantes do Brasil, ocupando segundo lugar na produção total de grãos, perdendo apenas para a soja segundo o 7º levantamento da Companhia Brasileira de Abastecimento (CONAB) em 2017 e publicado pelo DEAGRO em abril de 2017.

Somando-se a esse fato, os desafios da agricultura na sociedade, a evolução da industrialização permitiu um grande aumento na produção, o que atendeu a demanda populacional. Além disso, o desenvolvimento de produtos que ajudam a aumentar essa produção, como fertilizantes e agrotóxicos, por exemplo, também cresceram em larga escala com o avanço do processo industrial.

A adubação química trouxe várias vantagens à agricultura, como aumento da produtividade com menor custo por unidade. Porém, apesar de extremamente importantes, os impactos ambientais foram igualmente grandes e podemos citar a salinização dos solos, eutrofização das águas, a lixiviação e a desertificação e, hoje em dia e em um futuro próximo, precisaremos achar soluções e maneiras de evitar esses impactos, mas sem deixar a produtividade cair (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Uma das maneiras de alcançarmos o objetivo de mantermos a alta produção com o menor impacto possível é a utilização dos microrganismos promotores de crescimento vegetal, uma vez que suas habilidades permitem que a planta se desenvolva em um processo cada vez menos industrializado, já que todo o maquinário e recurso encontram-se disponível na natureza. Dessa maneira, as principais culturas mundiais podem ser afetadas positivamente pelo aumento na utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal, podemos citar as culturas do milho, arroz, soja, trigo e feijão (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Os microrganismos que comumente habitam o vegetal podem ser bactérias, arqueas, vírus ou fungos (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016), habitando tanto a rizosfera, que compreende a área ao redor da raiz e que abriga uma série de

microrganismos com características diversas (CHAUHAN et al., 2017) quanto à parte área dos vegetais, mas também podem colonizar as partes internas do vegetal. O sucesso do estabelecimento dos microrganismos em um ambiente depende das interações entre os microrganismos e o ambiente, que envolve transferências de informações moleculares e genéticas (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016). O primeiro passo para o estabelecimento da relação entre bactérias e plantas é o reconhecimento dos exudatos da planta no solo pelos microrganismos (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016). As plantas, então, seriam capazes de selecionar os microrganismos através de seus exudatos, que são compostos de aminoácidos, carboidratos e ácidos orgânicos que podem variar de acordo com as condições bióticas e abióticas do meio (HALDAR; SENGUPTA, 2015).

Posto isto, o presente estudo teve por objetivos isolar e identificar bactérias epífitas e endofíticas colonizadoras do milho, com habilidades de solubilização de fósforo, fixação biológica do nitrogênio e produção de ácido indol acético.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Microrganismos promotores de crescimento de plantas (MPCP)

Microrganismos que podem habitar e colonizar as plantas e possuem a capacidade de contribuir para seu desenvolvimento são conhecidos como microrganismos promotores de crescimento vegetal. Os benefícios de bactérias promotoras de crescimento vegetal são muitos e possíveis de serem diferenciados em diretos (KUSS et al., 2007) como a fixação de nitrogênio (Baldani *et. al*, 2000), solubilização de fósforo (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; GULATI *et. al*, 2009), produção de fitohormônios (MARIANO; KLOEPPER, 2000), ou indiretos (KUSS et al., 2007; ASGHAR *et. al*, 2002) como o controle biológico (YANG; KLOEPPER; RYU, 2009) crescimento de raízes, atraso na senescência (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014), aumento da superfície foliar, aumento do diâmetro do caule e crescimento das raízes.

2.1.1. Benefícios indiretos dos MPCP

2.1.1.2. Antagonismo

Quanto à atuação indireta das bactérias promotoras de crescimento de plantas, o biocontrole pode dar-se por antagonismo, propriedade conhecida de bactérias do gênero *Bacillus*, por exemplo, que inclui a inibição do patógeno por antibióticos, toxinas, competição por minerais, nutrientes e locais de colonização (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

2.1.1.3. Indução no sistema de resposta da planta

A indução do sistema de resposta da planta acontece através da associação entre organismos não patogênicos e a planta, através da sinalização por moléculas indutoras, como polissacarídeos da parede celular (BERG, 2009; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014), onde a resposta do vegetal à invasão é dependente do etileno e do ácido jasmônico (VAN LOON, 2007). O gênero *Bacillus* está incluso entre aqueles que foram descritos como capazes de induzir o sistema de resposta da planta (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

2.1.1.4. Interferência no sistema “*quorum sensing*”

O *quorum sensing* é um sistema onde bactérias podem regular a expressão de seus genes em resposta a mudanças da densidade populacional, através da comunicação celular (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994). O *quorum sensing* é mediado por moléculas como a acil-homoserina-lactose (AHL), que induz a expressão de genes envolvidos na produção de fatores de virulência ou na formação de biofilme (QUIÑONES; DULLA; LINDOW, 2005). Bactérias, como as do gênero *Bacillus*, produzem enzimas lactonase que degradam as moléculas de AHL interferindo no *quorum sensing*, impedindo assim o surgimento dos fatores de virulência das bactérias patogênicas (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014), como comprovado por Dong et al. (2002), onde a virulência da *Erwinia carotovora*, regulada por *quorum sensing*, foi atenuada pela ação da enzima lactonase produzida por bactérias do gênero *Bacillus*.

2.1.1.5. Rizadorremediação

Outro benefício seria a rizadorremediação, onde bactérias promotoras de crescimento de plantas degradam poluentes, compostos orgânicos e herbicidas, permitindo o crescimento dos vegetais em locais antes poluídos (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). A resistência a situações de estresse também é aumentada pela associação entre os vegetais e as bactérias promotoras de crescimento de plantas.

Nessas situações de estresse as plantas produzem mais etileno (Argueso *et. al*, 2007), o que pode causar queda das folhas e danos às células vegetais (DESBROSSES *et al.*, 2009). Os microrganismos são capazes de inibir a via bioquímica produtora de etileno e, conseqüentemente, diminuir os níveis de etileno no vegetal (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014).

2.1.2. Benefícios diretos dos MPCP

2.1.2.1. Fixação do nitrogênio

Quando falamos sobre os benefícios diretos da atuação dos microrganismos promotores de crescimento de plantas, a fixação do nitrogênio aparece como a principal delas. O nitrogênio é o principal elemento exigido pelas plantas sendo constituinte de aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila e hormônios e, que embora esteja na atmosfera de maneira abundante (78%), sua assimilação depende da conversão para a forma nitrato realizada por microrganismos em um processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio, contribuindo com aproximadamente 65% do nitrogênio fixado (NEWTON; NYMAN, 1999). A maioria dos microrganismos fixadores de nitrogênio evoluiu no sentido de colonizarem a rizosfera das plantas (SPRENT; FARIA, 1989), e os resultados dessa associação na disponibilidade de nitrogênio fornecido às plantas é bastante significativa (BODDEY *et al.*, 1983).

As plantas conhecidas como leguminosas apresentam, em suas raízes, uma associação simbiótica com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que formam nódulos nas raízes de plantas como a soja, alfafa, amendoim e ervilha, que convertem o nitrogênio atmosférico em amônia que pode ser utilizado pelas plantas como fonte de nitrogênio (MURRAY, 2011). Porém, em plantas não leguminosas, essa relação simbiótica não existe, para tanto algumas bactérias não simbiontes presentes na rizosfera são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico para formas assimiláveis pelos vegetais. Das espécies fixadoras é possível citarmos algumas

530 muito estudadas como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia* e *Bacillus*, e as
531 plantas que se beneficiam dessa relação com essas bactérias de vida livre como o
532 milho, arroz e sorgo, por exemplo. O gênero *Bacillus* é constantemente descrita
533 como bactéria fixadora de nitrogênio, sendo frequentemente isolada do trigo, cana-
534 de-açúcar e do milho (SELDIN; VAN ELSAS; PENIDO, 1984).

535 Diversas espécies já foram documentadas como sendo fixadoras de nitrogênio,
536 além do gênero *Bacillus*, bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam dentro de
537 seu grupo diversas espécies com habilidade de fixar nitrogênio, sendo inclusive
538 dominantes na rizosfera de algumas espécies vegetais (CHEN et al., 1994). O
539 gênero *Bacillus* apresenta uma característica interessante no que se refere à fixação
540 biológica do nitrogênio, onde sua atividade se mantém elevada mesmo em solos
541 com alta concentração de nitrato (KUSS et al., 2007). As espécies de *Azospirillum sp.*
542 apresentam larga distribuição nos solos tropicais (DOBEREINER; DEPOLLI, 1980) e
543 sua habilidade de fixar nitrogênio é amplamente testada. A espécie *Azospirillum*
544 *brasiliensis* foi testada em milho, sorgo e trigo e seu aproveitamento mostrou-se
545 mais do que satisfatório, principalmente quando relacionado com o aproveitamento
546 do nitrato no solo (FERREIRA; FERNANDES; DOBEREINER, 1987).

547 Quanto ao endofitismo, inúmeras bactérias vem sendo testadas para melhor
548 entendimento da relação entre fixação do nitrogênio e colonização endofítica. É
549 possível salientarmos as bactérias *Herbaspirillum seropedicae* que pode ser isolada
550 da cana-de-açúcar, milho e arroz (OLIVARES et al., 1996), e o gênero *Burkholderia*
551 isolado do arroz, cana-de-açúcar, batata doce e mandioca (TRAN VAN; GILLIS,
552 1994), onde foi possível observar a colonização de tecidos vasculares por essas
553 bactérias diazotróficas.

554 Tratando especificamente do gênero *Bacillus*, a atividade da enzima
555 nitrogenase foi detectada nas espécies de *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*,
556 *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (XIE; SU; CUI et al., 1998).

557 As bactérias que realizam a fixação biológica do nitrogênio possuem essa
558 habilidade devido ao seu maquinário enzimático, principalmente a enzima
559 nitrogenase. Industrialmente existe uma solução para a fixação do nitrogênio, o

processo conhecido como Haber-Bosch, no qual o nitrogênio atmosférico é convertido em amônia. Porém as exigências deste processo são muito caras, a fixação industrial do nitrogênio demanda altas pressões (200 bar ou 197 atm) e temperaturas de 500 a 600°C (RIBEIRO, 2013). Por isso a fixação biológica do nitrogênio torna-se uma alternativa interessante ao processo Haber-Bosch.

A fixação biológica do nitrogênio pode ser pouco notada quando relacionamos seus resultados e eficiência a plantas como o milho, que possuem uma via metabólica C4 altamente eficiente que é capaz de converter intensidades de energia solar duas vezes maiores (DOBEREINEIR; BALDANI; BALDANI, 1995) e, nessas plantas, a maioria das pesquisas com bactérias fixadoras de nitrogênio foi realizada com inoculação do *Azospirillum* (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004). No entanto, os resultados com a inoculação dessa bactéria, geralmente associada a doses variáveis de fertilizantes nitrogenados (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), apesar de positivos são muito variáveis, por isso, e pela tendência da pesquisas caminharem no sentido do estudo de bactérias endofíticas, mais trabalhos tem sido realizados com os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, que são encontrados em alta taxa no interior dos tecidos do milho.

2.1.2.2. Solubilização de fósforo

Outro benefício direto dos microrganismos promotores de crescimento de plantas diz respeito ao segundo elemento mais exigido pelos vegetais, o fósforo que está relacionado ao armazenamento e transferência de energia na planta, na forma de ATP (FORNASIERI FILHO, 1992). Apesar de o solo apresentar grande reserva de fósforo, a maior parte está na forma insolúvel (PRINSEN et al., 1999), uma vez que está associado ao fosfato de alumínio e de ferro em solos ácidos ou a fosfatos de cálcio em solos alcalinos (CHAUHAN et al., 2017), que não pode ser absorvida pelas plantas, limitando seu crescimento (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004). A maior reserva de fósforo são as rochas primárias, formadas durante a era geológica (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

A maior parte dos solos agrícolas apresentam grande disponibilidade de fósforo, em decorrência das aplicações regulares de fertilizantes. No entanto, grande porção desse fósforo é rapidamente imobilizado, tornando-se indisponível para as plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

As plantas precisam que o fósforo presente no solo esteja na forma solúvel para que elas possam absorvê-lo, solubilização que pode ser realizada pelos microrganismos promotores de crescimento vegetal, como as bactérias *Bacillus*, *Azospirillum* e *Erwinia* (SUDHAKAR et al., 2000; MEHNAZ; LAZAROVITZ, 2006; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014), por exemplo

Vale ressaltar que, mesmo que a variedade de bactérias solubilizadoras no solo seja alto, sua concentração é baixa e, para que a quantidade de fósforo liberado pelos microrganismos seja suficiente para o crescimento da planta, é necessário a inoculação dessas bactérias em concentrações elevadas (BERG et al., 2009). A inoculação conjunta de espécies solubilizadoras de fósforo e fixadoras de nitrogênio pode prover uma nutrição mais adequada e promover um efeito sinérgico na promoção de crescimento (BELIMOV; KOJEMIAKOV; CHUVARLIYEVA, 1995).

Apesar de ainda não ser totalmente compreendido o mecanismo genético pelo qual as bactérias conseguem realizar tal solubilização, acredita-se que esteja relacionado à produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido glucônico, mas também é possível citarmos outros ácidos envolvidos na solubilização tais como, o ácido cetoglucônico, ácido láctico e ácido acético (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999) e também pela ação da glucose desidrogenase (CHAUHAN et al., 2017). Outras enzimas que atuam na solubilização de fósforo, que também pode ser chamada de mineralização, são as fosfatases, que podem ser classificadas como ácidas ou alcalinas, de acordo com o pH ótimo de atividade (RICHARDSON et al., 2009).

Outro mecanismo para a mineralização envolve a liberação de prótons H^+ para a superfície celular através do auxílio de ATPases, dessa maneira, a quelação ou a produção de ácidos inorgânicos (como o ácido sulfídrico ou nítrico), constituem um mecanismo alternativo para a solubilização de fósforo (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Essas bactérias, portanto, são capazes de solubilizar o fósforo pela acidificação (RICHARDSON et al., 2009), quelação ou por meio de processos enzimáticos (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

2.1.2.3. Produção de fitohormônios

A fitoestimulação também se enquadra em um benefício direto dos microrganismos promotores de crescimento vegetal. A produção de fitohormônios, que são hormônios vegetais reguladores de crescimento e podem ser classificados como citocinina, giberilina, etilenos e auxinas, também é uma capacidade encontrada nos microrganismos que vivem em associação com as plantas e estimulam seu crescimento.

As citocininas são fitohormônios que estimulam a divisão celular, chamada de citocinese. Elas são produzidas, por embriões, frutos e pelas raízes, de onde são transportadas pelo xilema para toda a planta (DEMASON, 2005).

A atuação da citocininas se dá no controle da dominância apical (em conjunto com as auxinas), no atraso da senescência e no crescimento das raízes (SKOOG; MOLEIRO, 1957).

As giberelinas são hormônios produzidos principalmente nas raízes e nos primórdios foliares, estimulando o crescimento de caules e folhas, mas têm pouco efeito sobre o crescimento das raízes. As giberelinas podem atuar em conjunto com as auxinas no desenvolvimento dos frutos e com as citocininas na germinação (ROSS et al., 2000).

O etileno, único fitohormônio na forma de gás, é produzido em diversas partes da planta e difunde-se no ar existente entre as células. Sua atuação dá-se no amadurecimento dos frutos e na queda das folhas, juntamente com a auxina. O etileno, enfraquece as células a tal ponto que o peso da folha é suficiente para romper sua ligação com o caule, causando a queda da folha. A auxina e o etileno

gasoso são intimamente relacionados, exposição da auxina estimula a produção do etileno (MORGAN, 1962) com a indução de um gene que codifica uma enzima da biossíntese do etileno (ABEL; OELLER; THEOLOGIS, 1994). Já o etileno inibe transporte da auxina ao longo do vegetal (BURG; BURG, 1966).

Dentre as auxinas, sua forma predominante e mais encontrada nas plantas é o ácido indol acético (AIA), cujo principal efeito é a promoção de crescimento vegetal e que também pode ser produzido por microrganismos (BOIERO et al., 2007). Essa substância é produzida majoritariamente no meristema apical e transportada para o vegetal pelas células parenquimáticas, atingindo as raízes (ONA et al., 2003).

O principal efeito do ácido indol acético, e das auxinas de maneira geral, é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas, o que depende da concentração do fitohormônio. Em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular. Porém, em altas concentrações, as auxinas inibem o alongamento celular e, portanto, o crescimento do órgão (PATTEN; GLICK, 2002).

Bactérias usam os fitohormônios para interagir com as plantas como parte de sua estratégia de colonização, incluindo a fitoestimulação e para evitar os mecanismos de defesa da planta (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014). Estudos recentes indicam que a molécula de AIA pode funcionar como uma molécula sinalizadora bacteriana e possa ter efeitos diretos na fisiologia bacteriana (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). A produção de ácido indol acético por bactérias tem sido relacionada com a influência de alguns fatores ambientais, como acidez do solo, estresse osmótico e baixa concentração de carbono no solo (ONA et al., 2003; VANDE BROEK et al., 2005; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Um aumento na produção de ácido indol acético por bactérias foi percebido em baixas concentrações de carbono no solo e na redução da taxa de crescimento bacterianos, que coincidem com a entrada da fase estacionária da curva de crescimento bacteriano (SALEH; GLICK, 2001; PATTEN; GLICK, 2002).

2.2. Bactérias epífitas e endofíticas

As bactérias que habitam o vegetal podem ser diferenciadas em epífitas, que são aquelas que habitam a superfície vegetal (JACQUES; MORRIS, 1995; ANDREWS; HARRIS, 2000), ou endofíticas, bactérias habitantes do interior do vegetal (PETRINI; PETRINI; LAFLAMME, 1989; AZEVEDO et al., 2000; KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2004) e, ambas as bactérias (epífitas e endofíticas) não causam danos ao hospedeiro.

Quanto a colonização endofítica, ela foi considerada uma propriedade restrita à bactérias causadoras de doenças na planta, também chamadas de fitopatogênicas (NEVES et al., 1985), o que foi desmentido ao longo do avanço científico e maior conhecimento da interação bactéria-planta. A preferência microbiana pelo endofitismo pode ser resultado de um meio livre das condições adversas comumente encontradas no solo e uma maior disponibilidade de carbono (OLIVARES, 1996).

As bactérias endofíticas não aparecem dessa maneira no vegetal, mas tornam-se endofíticas ao longo de seu ciclo de vida, por isso podemos dizer que uma bactéria endofítica é aquela que vive pelo menos uma parte de seu ciclo de vida no interior das plantas (BALDANI; SALLES; OLIVARES, 2000). Uma bactéria endofítica pode ser, portanto uma bactéria epífita ou da rizosfera que invadiu o vegetal e instalou-se em algum de seus órgãos, como a própria raiz, o caule ou as folhas. Os microrganismos endofíticos podem penetrar nas plantas por aberturas e feridas, como aquelas existentes na emergência de raízes secundárias laterais ou nas abrasões geradas pelo crescimento das raízes penetrando no solo (Azevedo, 2000). Bactérias endofíticas também podem invadir o vegetal através dos estômatos e hidatódios (MANHÃES, 2014), através de aberturas causadas por inseto assim como por feridas deixadas em plantas onde ocorre a colheita de frutos. Os endofíticos são capazes de adentrar o hospedeiro de ativamente, pela produção de enzimas (Azevedo, 2000). Paula, Reis e Dobereiner (1991) comprovaram que estruturas do fungo patogênico *Glomus clarum* continham a bactéria conhecida endofítica *Acetobacter diazotrophicus* em seu interior e facilitou a invasão dessa bactéria no vegetal.

A capacidade de viver dentro do vegetal constitui uma adaptação interessante às bactérias, uma vez que sofrerão menor efeito da competição com outros microrganismos, não enfrentarão as condições ambientais adversas e terão alta taxa de nutrientes disponíveis e livres para sua nutrição. (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990). Em geral esses microrganismos podem estar localizados em tecidos vasculares ou espaços intercelulares, sendo as raízes a principal entrada para a invasão desses microrganismos no vegetal, devido à facilidade com que lesões e arranhões, decorrentes do crescimento vegetal, surgem nesse órgão (Azevedo et al., 2000).

2.3. Milho

O milho é uma das mais antigas culturas cultivadas no mundo, havendo registros de que seu cultivo começou há, pelo menos, 6.000 anos (PIPERNO; FLANNERY, 2001). Em escala mundial, o milho ocupa posição de destaque em produção global com valores equivalentes a 1.053,8 milhões de toneladas para a safra 2016/2017, um aumento de 9,4% em relação à safra anterior, segundo o 12º levantamento do Departamento de Agricultura do Estados Unidos (USDA) Para o milho (*Zea mays L.*), e publicado no informativo do Departamento do Agronegócio (DEAGRO) da FIESP em abril de 2017, onde o Brasil ocuparia a terceira posição na produção global de milho, saltando de 67,0 milhões de toneladas na safra 2015/2016, para 93,5 milhões de toneladas na safra 2016/2017, um aumento de 39,6% e ficando atrás dos Estados Unidos e da China.

De acordo com esse mesmo levantamento, o consumo e a exportação mundial do milho também aumentarão. Quanto ao consumo mundial, os valores da safra 2016/2017 devem atingir valores equivalentes a 1.042,6 milhões de toneladas, superior em 6,3% em relação à safra passada. Já para a exportação mundial do milho, o Brasil ocupa a segunda posição, atrás apenas dos Estados Unidos, sendo responsável por 32 milhões de toneladas exportadas, com um aumento de 128,6%

em relação à safra 2015/2016. A exportação mundial do milho alcançaria, então, valores de 154,4 milhões de toneladas na safra atual, 28,6% maior que a anterior.

A nível nacional, o milho também se destaca, na produção de grãos do Brasil o milho ocupa a segunda posição, perdendo apenas para a soja e sendo responsável, junto com esta por 90% da produção total de grãos no país, segundo o 7º levantamento da Companhia Brasileira de Abastecimento (CONAB) em 2017 e publicado pelo DEAGRO em abril do mesmo ano. De acordo com esse levantamento, a produção do grão de milho no Brasil na safra 2016/2017 e sua comparação com a safra 2015/2016 segue conforme a tabela 1.

O plantio ocorre praticamente durante o ano todo e, para facilitar o acompanhamento do plantio, cada cultura foi denominada de acordo com a época de plantio, dessa maneira temos, milho safra ou primeira safra, plantado de agosto a dezembro; e milho safrinha ou segunda safra, plantado de janeiro a maio. A melhor época para plantio ocorre na 1ª safra, e a safrinha historicamente apresentava resultados inferiores, mas como é possível perceber da tabela 1, tanto na safra 2015/2016, quanto na safra 2016/2017, o milho 2ª safra (safrinha), superou os valores do milho 1ª safra, o que pode ser explicado pela concentração de nutrientes disponíveis no solo ou por um aumento na utilização de tecnologias durante a época de plantio do milho safrinha.

Atualmente, a demanda pela produção do milho é ainda maior, uma vez que ele também é utilizado na produção do etanol, o que também provoca um aumento nos preços, a maior parte da produção do grão de milho, no entanto, é destinada ao preparo de rações para animais.

Da Róz (2003) afirma que uma crescente parcela da produção do grão de milho está sendo destinada à alimentação humana direta, como farinhas, cereais e salgadinhos, e continua dizendo que a participação do milho crescerá no setor de plásticos biodegradáveis partir do milho.

Ainda sobre o milho é possível explicitar uma dualidade existente entre grandes produtores e os produtores que não estão ligados à produção comercial. No primeiro caso, salientamos a utilização de tecnologia e alto investimento de capital que se

reflete na produtividade. Por outro lado, temos os produtores que fazem pouco uso da tecnologia e não têm grandes extensões de terra, produzindo para subsistência e comercializando o excedente, fator que reflete na produtividade média (DUARTE, 2004).

Para a melhoria da produção com menor impacto ambiental, é possível citar as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Bacillus* como promotoras de crescimento vegetal, beneficiando o milho na fixação do nitrogênio, solubilização do fósforo e na produção de ácido indol acético (RIGGS et al., 2001; SHAHAROONA; ARSHAD; ZAHIR et al., 2006).

Tabela 1 - Produção total de grãos no Brasil durante as safras 2015/2016 e 2016/2017 e comparação entre ambas às safras.

Produto	Produção (mil toneladas)			
	Safra 15/16	Safra 16/17	Variação	
			Mil toneladas em relação à safra 15/16	Porcentagem em relação à safra 15/16
Algodão - caroço	1.937	2.213	276	14,2
Arroz	10.603	11.948	1.345	12,7
Feijão	2.516	3.286	773	30,7
Feijão 1 ^a safra	1.034	1.380	345	33,4
Feijão 2 ^a safra	915	1.217	304	33,3

Feijão 3 ^a	567	689	123	21,7
safra				
Milho	66.980	91.469	24.938	37,5
Milho 1^a	25.854	29.861	4.103	15,9
safra				
Milho 2^a	41.126	61.607	20.835	51,1
safra				
Soja	95.435	110.162	14.727	15,4
Trigo	6.164	5.468	-1.259	-18,7
Demais	2.769	3.388	522	18,2
Brasil	186.404	227.932	41.322	22,1

Fonte: Departamento do Agronegócio – DEAGRO/FIESP (modificado).

Os dados apresentados evidenciam a importância de estudarmos soluções biológicas para mantermos a produtividade da cultura do milho sem nos descuidarmos da preocupação atual de diminuir os impactos ambientais. Dessa maneira, a busca por microrganismos produtores de crescimento de plantas que atuem na cultura do milho e um melhor entendimento de seus mecanismos de atuação também ganha relevância.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Processamento da amostra e isolamento das bactérias epífitas e endofíticas cultiváveis*

O processamento seguiu a metodologia de KUKLINSKY-SOBRAI, et al. (2004), com modificações. Uma planta de milho da fazenda localizada na UNESP – Jaboticabal, em estágio V6, foi removida do solo com auxílio de uma espátula, e

transportada para o laboratório, sendo folhas, caules e raízes separadas e lavadas em água corrente para remoção do solo.

As bactérias epífitas foram isoladas pesando-se 3 gramas dos órgãos vegetais separadamente, e colocando-os em Erlenmeyer contendo 25 gramas de esferas de vidro de 0,1 cm de diâmetro e 50 mL de solução salina tamponada com fosfato (g l^{-1}) (Na_2HPO_4 : 1,44; KH_2PO_4 : 0,24; KCl : 0,20; NaCl : 8,00; pH 7,4), agitando-se na frequência de 150 r.p.m., a 28°C por 1 hora. Após a agitação, foram plaqueados 5 mL do conteúdo do Erlenmeyer em 10% de ágar de triptona de soja (TSA), e as placas mantidas a 28°C por até 15 dias. As colônias foram isoladas e repicadas em tubos inclinados de TSA (10%), mantidas a 28°C por 2 dias e, em seguida, armazenadas a 4°C.

As bactérias endofíticas foram isoladas após a remoção das epífitas, por desinfecção da superfície dos órgãos vegetais usando lavagem serial. A eficiência do processo de desinfecção foi verificado por plaqueamento de alíquotas de água destilada esterilizada usadas na lavagem final das plantas em 10% de ágar de triptona de soja que foram mantidas a 28°C por até 15 dias. Três gramas de cada órgão vegetal foram cortados e triturados em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato estéril. A solução resultante foi transferida para frascos de 50 mL, mantidos sob agitação constante a 28°C e 150 r.p.m. por 1 hora, sendo posteriormente plaqueado 5 mL em meio TSA (10%), e mantido a 28°C por até 15 dias. As colônias foram então isoladas e mantidas em tubos inclinados de TSA (10%), a 28°C por 48 horas e, por fim, armazenadas a 4°C.

3.2. Seleção das bactérias epífitas e endofíticas solubilizadoras do fósforo

A seleção das bactérias epífitas e endofíticas solubilizadoras de fósforo foi realizada de acordo com Verma, Ladha e Tripathi (2001). Os isolados foram cultivados em meio ágar contendo fosfato inorgânico (sendo os constituintes em g l^{-1} : ágar: 15; glicose: 10; NH_4Cl : 5; NaCl : 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 0,8; pH 7,2), sendo inoculadas cinco colônias por placa, mantidas a 28°C por 48 horas. A

solubilização do fósforo foi observada pela presença de halo claro em volta das colônias bacterianas com capacidade de solubilização do fosfato.

3.3. Seleção de bactérias epífitas e endofíticas fixadoras de nitrogênio

A habilidade de fixar o nitrogênio foi avaliada pela habilidade das bactérias crescerem em meio semissólido livre de nitrogênio, meio NFb (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Em cada placa foram repicadas 5 colônias, mantidas a 28°C por 48 horas. As bactérias com capacidade de fixação de nitrogênio foram identificadas pela presença de um halo de crescimento bacteriano no meio.

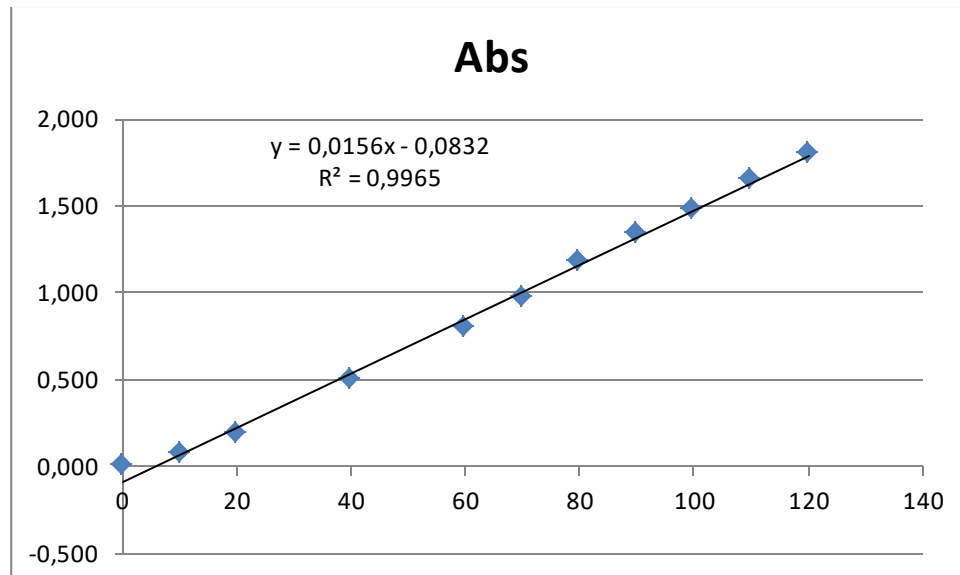
3.4. Seleção de bactérias epífitas e endofíticas produtoras de AIA

A produção do ácido indol acético (AIA) foi mensurada por meio da metodologia de Kuss et al. (2007) com modificações, em 80 isolados bacterianos.

Cada isolado bacteriano foi aplicado em 20 mL de meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose (DYGS) que contém em (g.L⁻¹): glicose: 2; peptona: 1,5; extrato de levedura: 2; dihidrogenofosfato de potássio: 0,5; sulfato de magnésio heptahidratado: 0,5; suplementado com 5mM de L – triptofano, incubadas por 48 horas, a 28°C, sob agitação constante de 120 r.p.m. e na ausência de luz (Andrade, 2012). Após esse período, 5 mL de cada cultura foi centrifugada a 10.000 r.p.m. por 10 minutos e transferidos, em seguida, 2 mL do sobrenadante para tubo de ensaio, contendo 2 mL do reagente de Salkowski 2% (p/v) (0,5M FeCl₃ em 35% de ácido perclórico) (SARWAR; KREMER, 1995), e incubados, na ausência de luz, por 30 minutos.

A produção de AIA foi determinada, qualitativamente, pela coloração avermelhada da solução contida no tubo de ensaio. Para a avaliação quantitativa do hormônio, foi feita leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530 nm. A concentração foi obtida pela leitura de meio de cultura estéril, não inoculado, com concentrações conhecidas de AIA comercial (0, 10, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 µgAIA/tubo). Para cada concentração foi feita duplicata, que foi

853 normalizada pela curva padrão resultando na equação $y = 0,0156x - 0,0832$ ($R^2 =$
 854 $0,9965$), onde “x” representa a concentração de AIA ($\mu\text{gAIA/tubo}$), e “y” é a
 855 absorvância média obtida no espectrofotômetro (Figura 1).



856

857 **Figura 1 – Gráfico da curva padrão encontrado para as leituras em duplicata das diferentes**
 858 **concentrações de AIA, após leitura em espectrofotômetro.**

859 A quantificação de AIA produzido por isolado bacteriano também foi realizada
 860 e, para tanto, utilizou-se uma bactéria conhecida produtora de ácido indol
 861 acético, o *Azospirillum sp.*, como controle positivo, e foram obtidos valores de
 862 produção de AIA para cada isolado. A porcentagem de AIA produzida foi obtida
 863 comparando-se com a quantidade média de AIA produzida pelo *Azospirillum* (em
 864 $\mu\text{g/ml}$).

865 **3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação,** 866 **sequenciamento e análise da região 16S rDNA bacteriano**

867

868 O DNA bacteriano foi extraído de 10 isolados, que se mostraram melhores
 869 produtores de ácido indol acético (AIA) e também apresentavam a capacidade de
 870 solubilizar fosfato e fixar nitrogênio, seguindo protocolo de kit de extração *Quick-*
 871 *DNA Universal Kit* (Zymo Research – cat. N° D4068 e D4069).

A amplificação do rDNA 16S foi realizada em um volume final de 25 µL contendo todos os reagentes necessários para a reação (em µL: água mili-q estéril, 11,3; 10 milimolar do primer F, 1,5; 10 milimolar do primer R, 1,5; tampão Taq green 5x, 5,0; MgCl₂, 3,0; 10 milimolar de cada dNTP, 1,0; Taq DNA polimerase, 0,2; DNA molde, 1,5). As condições da reação seguiram da seguinte maneira: 95°C durante 2 minutos seguidos por 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 63°C por 1 minuto e extensão do primer a 72°C por 1 minuto; seguido por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da reação foram verificados aplicando 5 mL do produto de PCR em 1,2% (P/V) de gel de agarose e revelando as bandas com brometo de etídio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Para identificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* e sequenciadas usando primer universal. As sequências foram editadas através do programa *Biological Sequence Alignment Editor – BioEdit* (HALL, 1999) e a sequência consenso foi obtida utilizando-se a ferramenta BLAST® (ALTSCHUL et al., 1990), comparada com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI – Genbank). As árvores filogenéticas resultantes foram construídas utilizando-se software MEGA7® (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4. RESULTADOS

O isolamento das bactérias epífitas no milho resultou em 182 isolados, dos quais 56% foram provenientes das folhas, 27% provenientes do caule e 17% foram extraídos da raiz. Quanto à busca por bactérias endofíticas obteve-se total de 138 isolados, desses 43% foram provenientes das folhas, 52% foram isolados do caule e 5% da raiz.

As bactérias epífitas foram diferenciadas segundo o órgão de colonização e características na promoção de crescimento da planta (Tabela 2).

900 Tabela 2 - Nº de isolados bacterianos epífitas no milho, em função do local de colonização e
 901 característica na promoção de crescimento da planta.

CARACTERÍSTICAS	COLONIZAÇÃO			TOTAL
	Folhas	Caule	Raiz	
Solubilização de P	95 (56%)	47 (28%)	28 (16%)	170
Fixação de N	43 (44%)	35 (36%)	19 (20%)	97
Produção de AIA	31 (59%)	14 (26%)	8 (15%)	53

902

903 Quanto às bactérias endofíticas, os isolados com capacidade de solubilização
 904 de fósforo, fixação de nitrogênio e produção de AIA foram selecionados e
 905 diferenciados de acordo com essas habilidades e também o órgão vegetal de
 906 colonização (Tabela 3).

907 Tabela 3 - Nº de isolados bacterianos endofíticos no milho, em função do local de colonização e
 908 característica na promoção de crescimento da planta.

CARACTERÍSTICAS	COLONIZAÇÃO			TOTAL
	Folhas	Caule	Raiz	
Solubilização de P	50 (41%)	66 (54%)	6 (5%)	122
Fixação de N	30 (54%)	21 (37%)	5 (9%)	56
Produção de AIA	8 (30%)	15 (55%)	4 (15%)	27

909

910 Após as análises quanto às habilidades dos isolados nas características
 911 relacionadas à promoção de crescimento das plantas, 80 isolados foram capazes de
 912 atender às 3 características pesquisadas, sendo o teor de AIA quantificado. Para a
 913 quantificação de AIA dos isolados utilizou-se o valor médio de 22,57 µgAIA/mL
 914 produzido pelo *Azospirillum* sp. (controle positivo), que foi obtido através da média
 915 dos valores de leitura, realizadas em duplicata, em espectrofotômetro (22, 76
 916 µgAIA/mL na primeira leitura, e 22,38 µgAIA/mL na segunda leitura). Desta maneira
 917 foram selecionados 10 isolados que produziram no mínimo 50% do total de AIA
 918 produzido pelo *Azospirillum* (tabela 4).

919

920 Tabela 4 - Quantidade de AIA produzida pelos isolados com no mínimo 50% de produção em relação ao
 921 *Azospirillum*.

CÓDIGO DO ISOLADO	µgAIA/mL	PORCETAGEM DE AIA PRODUZIDO EM
-------------------	----------	-----------------------------------

		RELAÇÃO AO <i>Azospirillum</i>
188	15,23	67,48
248	12,51	55,41
263	11,32	50,16
274	12,44	55,13
275	11,54	51,13
287	13,37	59,25
290	13,02	57,68
291	11,51	51,01
309	11,80	52,29
320	12,41	54,99

922

923 Todos esses isolados foram obtidos no interior da planta do milho, sendo que
924 1 colonizava as folhas, 8 o caule e 1 a raiz da planta.

925 O sequenciamento foi realizado para os 10 isolados bacterianos e, após
926 análise filogenética (figura 2), foram obtidas 8 sequências correspondentes a
927 *Bacillus subtilis*, 1 sequência equivalente a *Bacillus velezensis* e 1 alinhada com
928 *Lactococcus lactis* (tabela 5).

929 Tabela 5 - Identificação dos isolados solubilizadores de P, fixadores de N e melhores produtores de AIA e
930 órgão vegetal colonizado.

CÓDIGO DO ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	ÓRGÃO COLONIZADO
188	<i>Bacillus velezensis</i>	FOLHA
248	<i>Bacillus subtilis</i>	CAULE
263	<i>Bacillus subtilis</i>	CAULE
274	<i>Bacillus subtilis</i>	CAULE
275	<i>Lactococcus lactis</i>	CAULE
287	<i>Bacillus subtilis</i>	CAULE
290	<i>Bacillus subtilis</i>	CAULE
291	<i>Bacillus subtilis</i>	CAULE
309	<i>Bacillus subtilis</i>	CAULE
320	<i>Bacillus subtilis</i>	RAIZ

931

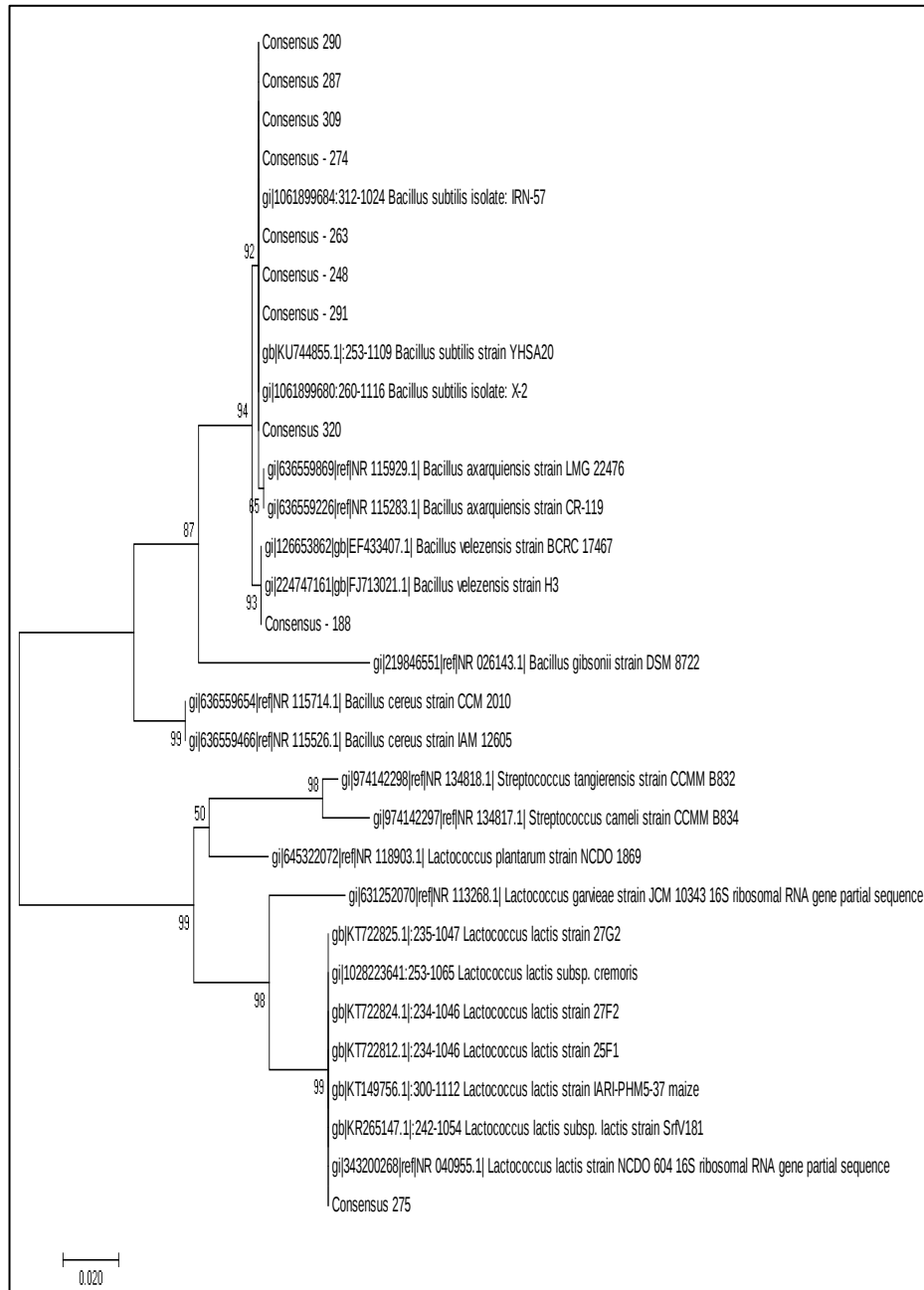


Figura 2 - Árvore filogenética baseada na comparação de nucleotídeos de sequências já conhecidas com as sequências obtidas de isolados da planta do milho.

Também foi realizada análise filogenética para cada isolado separadamente e foram geradas árvores filogenéticas para cada um destes isolados. O isolado 188, correspondente à espécie *Bacillus velezensis* alinhado com as linhagens da mesma espécies encontradas no banco de dados (Figura 3).

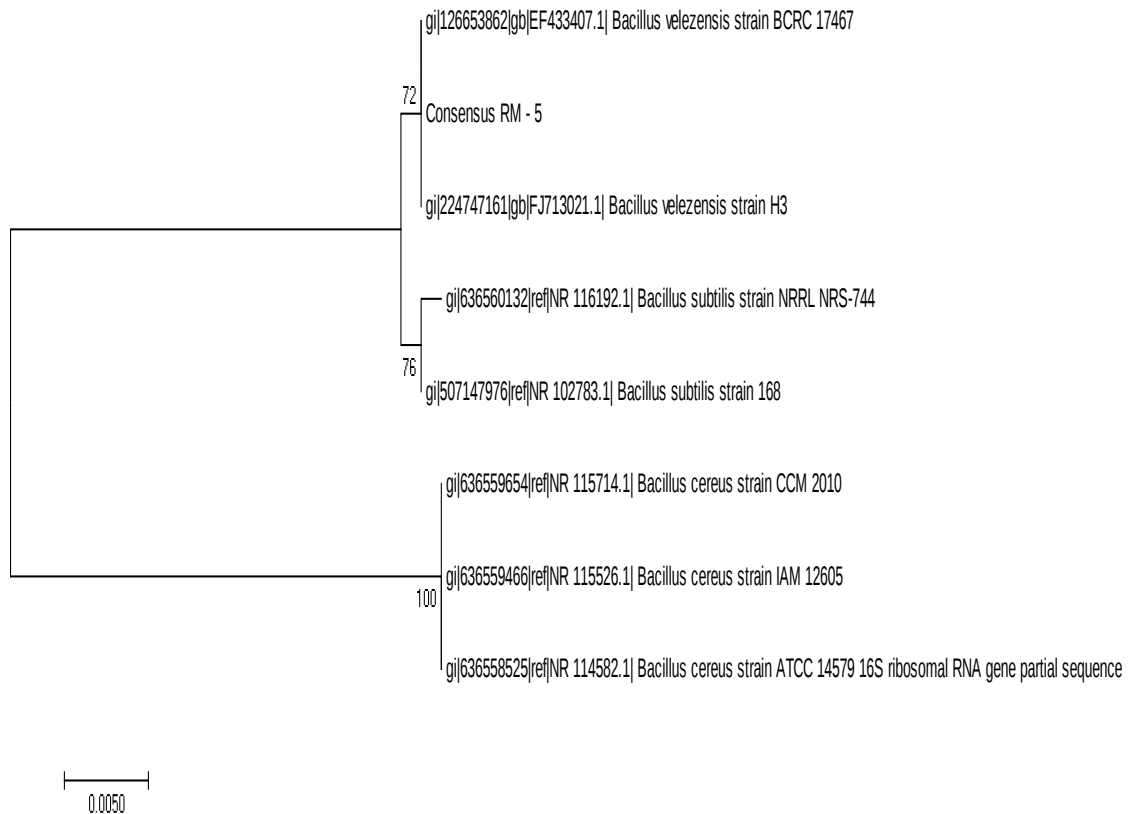


Figura 3 - Árvore filogenética do isolado 188, alinhado à espécie de *Bacillus velezensis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

O isolado 275 gerou como resultado a bactéria *Lactococcus lactis* após a comparação de nucleotídeos com o banco de dados (Figura 4).

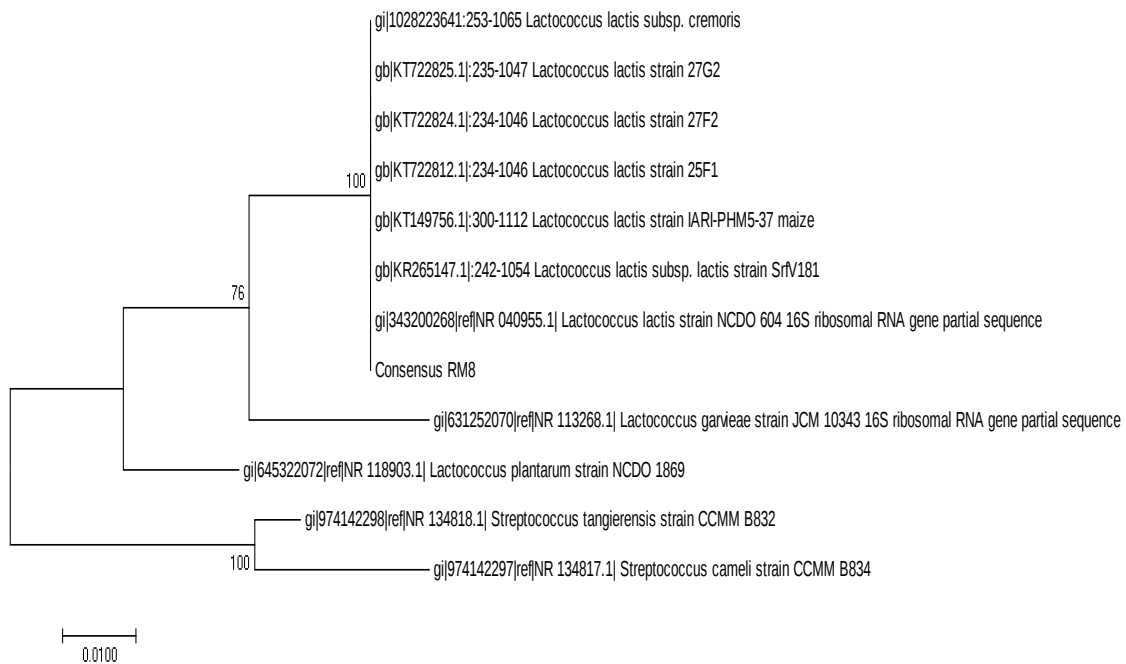


Figura 4 - Árvore filogenética do isolado 274, alinhado à espécie de *Lactococcus lactis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

Os isolados 248, 263, 274, 287, 290, 291, 309 e 320 foram todos alinhados com espécies de *Bacillus subtilis*, após a comparação com os nucleotídeos indexados no banco de dados (Figuras 5 a 12).

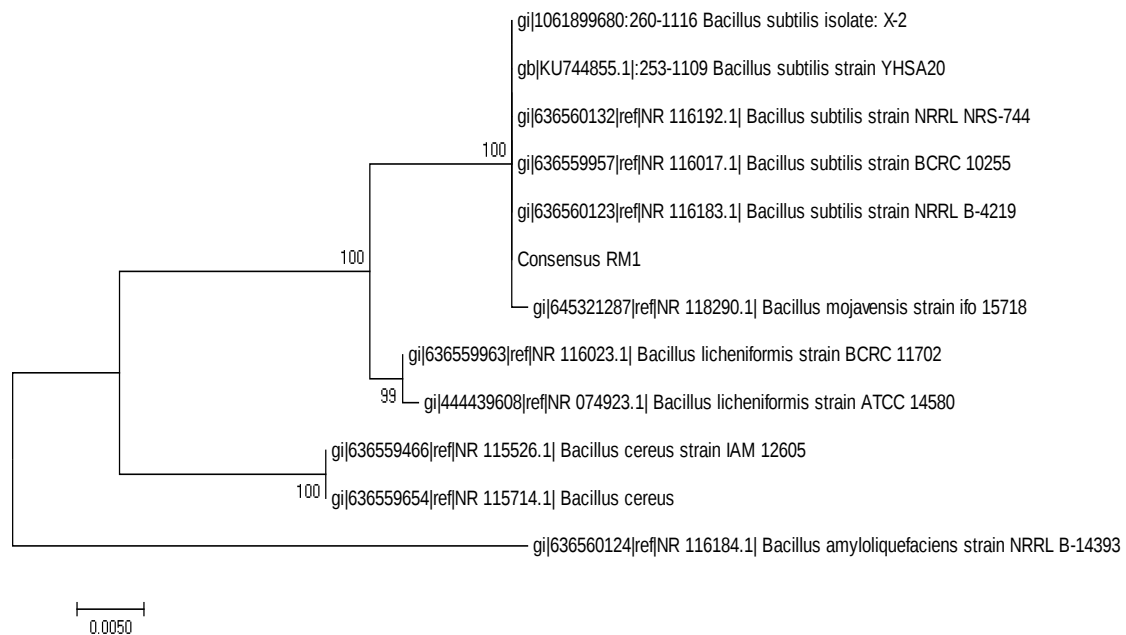


Figura 5 - Árvore filogenética do isolado 291, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

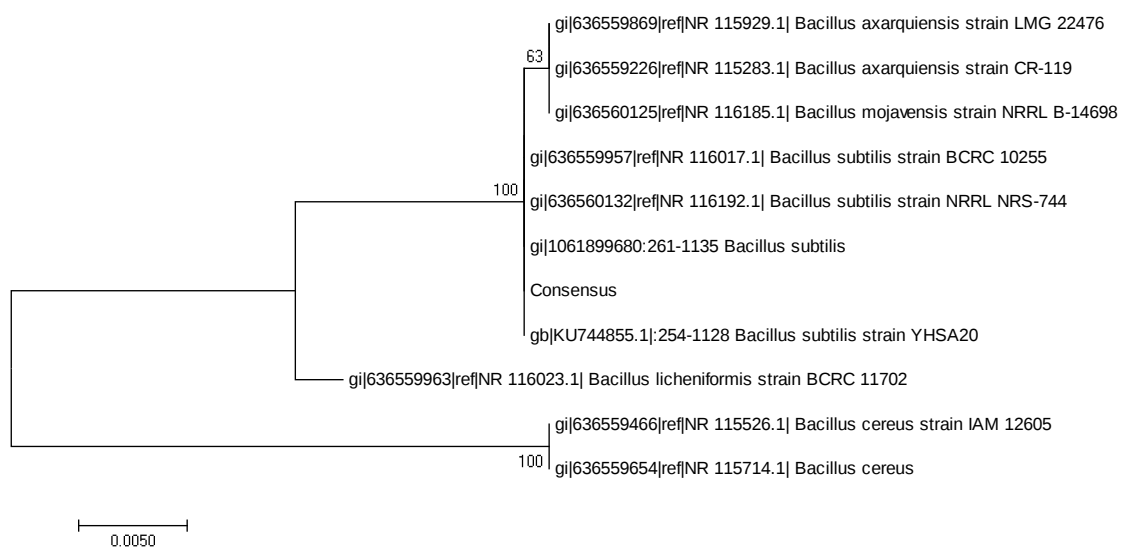


Figura 6 - Árvore filogenética do isolado 248, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

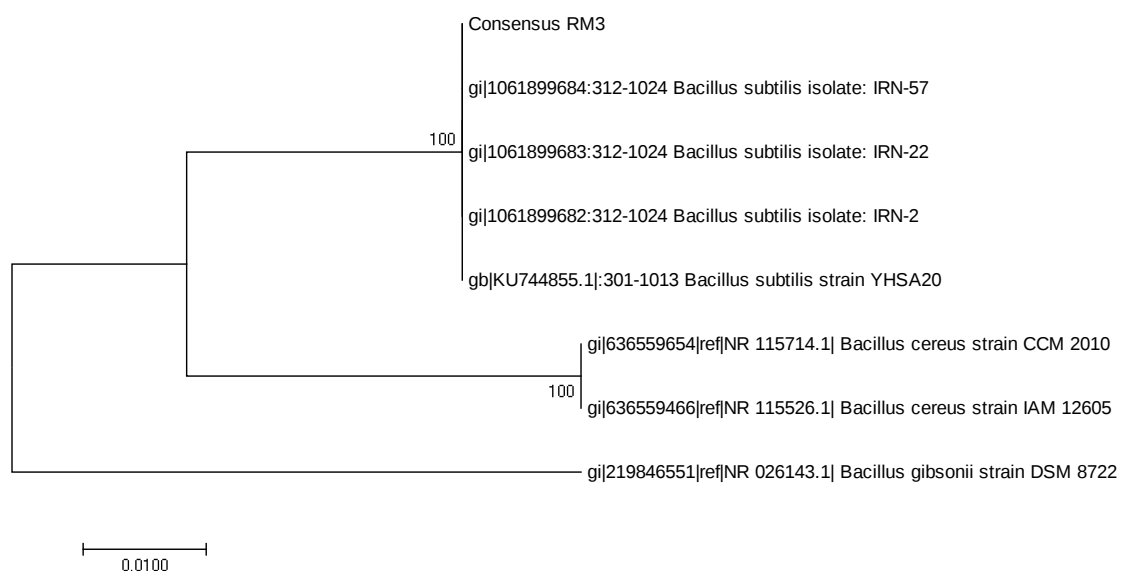


Figura 7 - Árvore filogenética do isolado 263, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

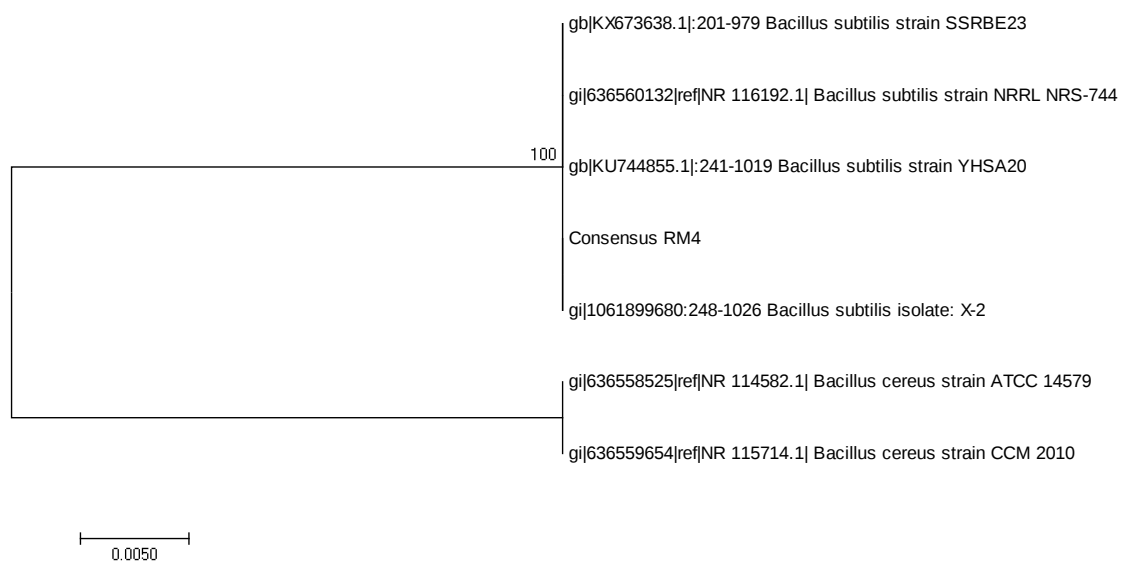


Figura 8 - Árvore filogenética do isolado 274, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

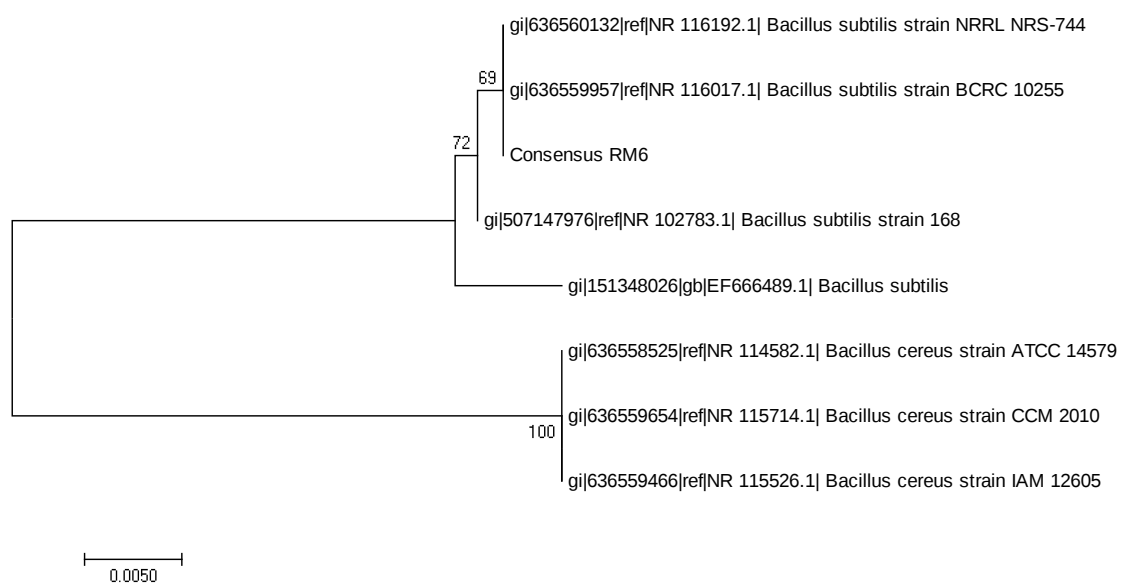


Figura 9 - Árvore filogenética do isolado 309, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

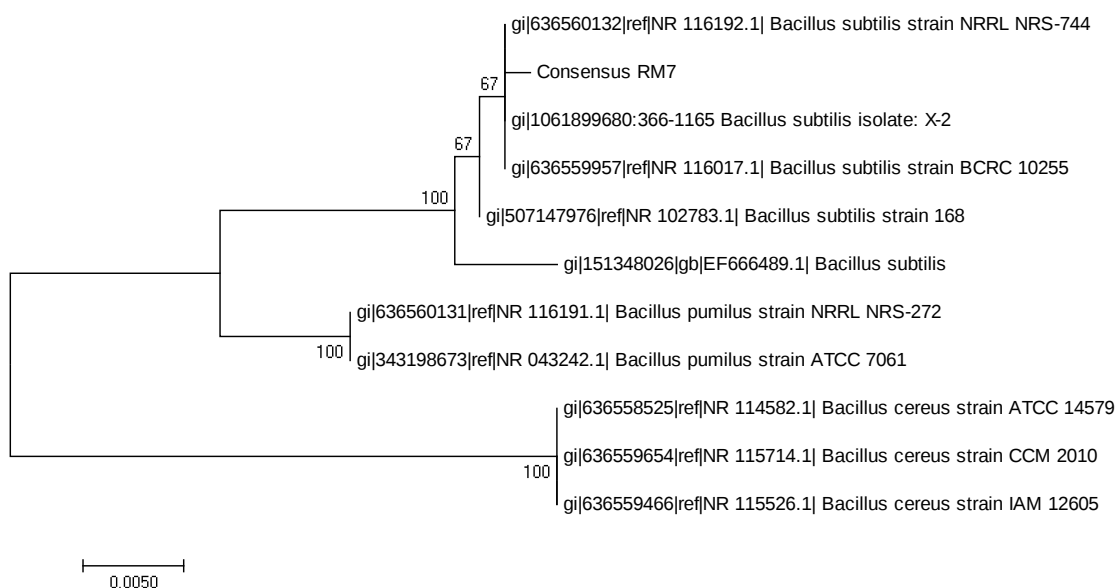


Figura 10 - Árvore filogenética do isolado 290, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

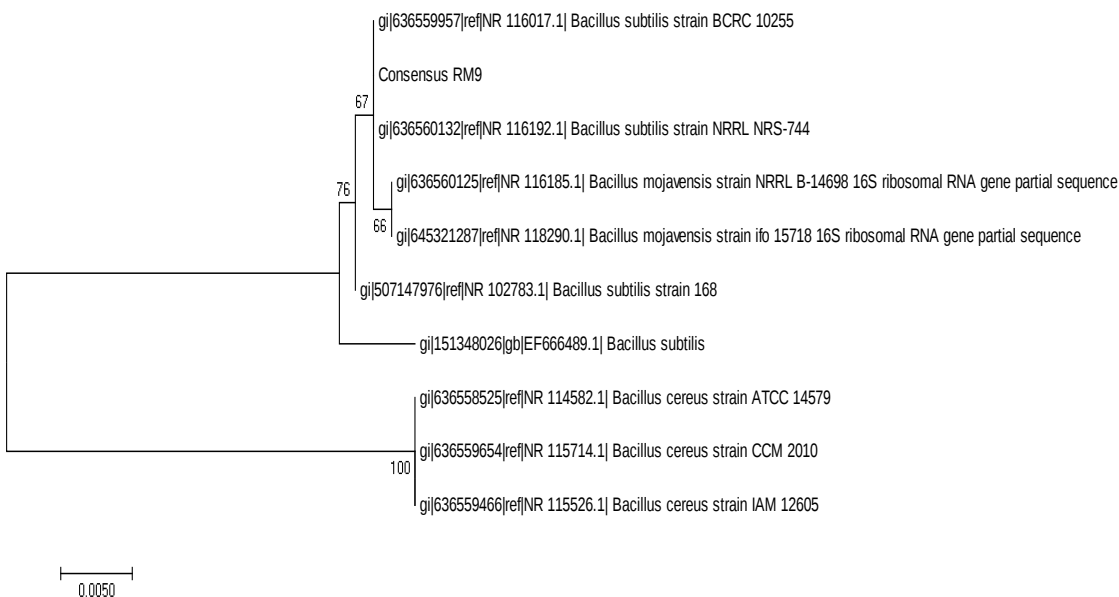


Figura 11 - Árvore filogenética do isolado 287, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

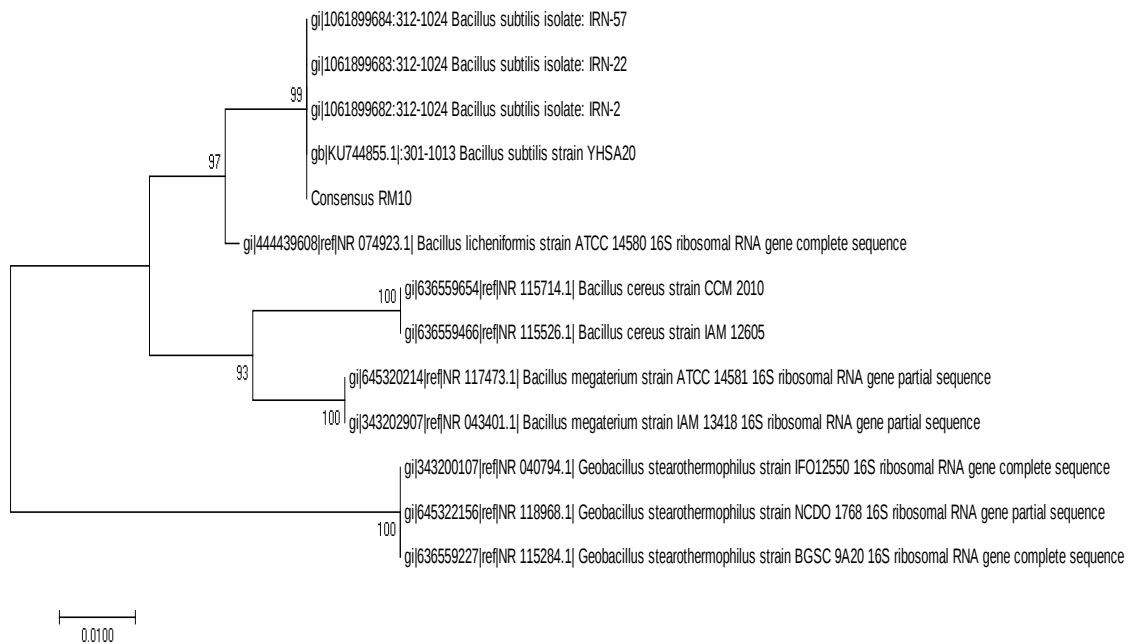


Figura 12 - Árvore filogenética do isolado 320, alinhado à espécie de *Bacillus subtilis*, após a comparação de nucleotídeos presentes no banco de dados com a bactéria retirada do milho.

5. DISCUSSÃO

O hábitat associado às plantas é um ambiente dinâmico em que vários fatores podem influenciar a população bacteriana que colonizará os tecidos vegetais, tais como mudanças climáticas, características do solo e tecido vegetal e as interações com a microbiota nativa (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; MOCALI et al., 2003).

Estudos demonstraram a busca por bactérias endofíticas promotoras de crescimento de plantas, cujas características são iguais às obtidas neste estudo (DA SILVA et al., 2016; ROESCH et al., 2007; MONTAÑEZ et al., 2012). Foram encontrados, dentre 320 isolados, 10 bactérias capazes de solubilizar fósforo, fixar nitrogênio e produzir AIA e diferentemente do trabalho de Da Silva et al. (2016) em que as bactérias foram encontradas majoritariamente na raiz, no presente estudo foram encontradas em sua maioria no caule. McInroy e Kloepper (1995) e Elvira-Recueno e van Vuurde (2000) observaram que plantas saudáveis de milho apresentam maior número de bactérias isolados na raiz e no caule, sendo que os microrganismos endofíticos tendem a migrar para o caule e partes aéreas durante o

desenvolvimento da planta, e que a preferência inicial pelas raízes deve-se a disponibilidade de nutrientes nestes órgãos (GLICK, 1995).

A quantidade de isolados do gênero *Bacillus* observado neste estudo (tabela 5) é semelhante aos resultados obtidos por Lalande et al. (1989) que identificou alta taxa desse gênero na rizosfera do milho e por CHIARINI et al. (1998), que reportaram o fato desse gênero ser comumente encontrado no interior da planta do milho.

Quanto ao fosfato, devido suas características reativas, a quantidade presente no solo pode ser alta, porém indisponível para a planta (LÓPEZ-BUCIO et al., 2002). Mesmo com a aplicação dos fertilizantes, o fósforo apesar de abundante, é rapidamente imobilizado (Rodríguez e Fraga, 1999). A capacidade dos microrganismos em solubilizar e disponibilizar este mineral para as plantas vem atraindo atenção e, dentre os gêneros bacterianos capazes de exercer essa função destaca-se o *Bacillus*, identificado nesse estudo. Além deste, pode-se citar também os gêneros *Pseudomonas* e *Agrobacterium* como eficientes solubilizadores (Rodríguez e Fraga, 1999). Andrade (2012) também reportou considerável número de espécies do gênero *Bacillus* como solubilizadores de fósforo, porém em outra cultura, a bananeira prata-anã. O fato dos microrganismos fornecerem aos vegetais o suprimento de fosfato inorgânico, atraiu o interesse quanto à sua utilização como inoculante comercial ou adicionado como fertilizante (SILVA; VIDOR, 2001).

O nitrogênio é um dos elementos mais abundantes nas plantas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; WILLIAMS; MILLER, 2001), sendo suas principais formas assimiláveis o nitrato e o amônio. 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 ceder fontes energéticas para a nutrição de bactérias diazotróficas (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). A fixação biológica do nitrogênio, realizada por microrganismos, é responsável por 65% do nitrogênio dos sistemas biológicos, convertendo o nitrogênio atmosférico (N₂), não assimilável pelas plantas, em suas formas assimiláveis.

A produção do AIA por bactérias depende de uma série de fatores, como o ambiente, por exemplo, bactérias produzem mais ácido indol acético em situações de baixa concentração de carbono no solo ou em casos de uma alta densidade populacional bacteriana (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Ambos os casos estão ligados à curva estacionária do crescimento bacteriano, e estariam associados ao fato de as bactérias utilizarem o ácido indol acético como sinalizadores às plantas a fim de facilitarem sua invasão no vegetal e adaptação ao estresse, o que permitiria uma melhor adaptação bacteriana ao tecido vegetal. As bactérias, ao produzirem AIA na rizosfera recebem sinais moleculares que ativariam a expressão de alguns genes envolvidos na virulência, adesão e adaptação ao estresse. Concomitantemente, a sinalização molecular na bactéria envia um “feedback” positivo à planta causando a multiplicação celular no vegetal. Nessa situação, a planta altera a composição de seus exudatos eliminando moléculas sinalizadoras que favorecem a colonização de bactérias durante a interação bactéria-planta (REMANS; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2006).

Outro fator relevante é o fato do AIA estar relacionado ao sistema de defesa do hospedeiro. Auxinas (como o AIA) e citocininas, produzidas pelas bactérias são capazes de bloquear enzimas do sistema de defesa do hospedeiro o que também facilitaria infecção bacteriana e posterior colonização dos tecidos e órgãos vegetais (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Mais fatores ambientais são relatados atuantes na síntese de ácido indol acético por bactérias, em *Bacillus* e outras rizobactérias, flavonoides produzidos pela planta hospedeira estimulam a produção de AIA.

Mas não apenas fatores ambientais afetam a síntese do AIA, fatores genético também influenciam essa habilidade. Primeiramente a localização dos genes plasmidial ou cromossomal, modulam os níveis de produção de ácido indol acético. Uma vez que os plasmídeos estão presentes em várias cópias na célula bacteriana, ele pode prover um alto número de genes envolvidos na produção de ácido indol acético (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Em segundo lugar, dois reguladores transcricionais, que regulam a transcrição de genes em resposta a situações de estresse e baixa concentração de nutrientes, e são induzidos no final

da fase logarítmica do crescimento bacteriano e tem papel na competitividade bacteriana na rizosfera, mostraram estar relacionados à síntese de ácido indol acético em bactérias. Essa característica melhoraria a adaptação bacteriana a situações de estresse (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Estes fatores ambientais e genéticos explicam o porquê de, apesar de 8 espécies isoladas serem de *Bacillus subtilis*, podemos considera-las linhagens diferentes. Além disso, como pode ser observado na tabela 4, cada um deles produziu uma quantidade diferente de AIA em relação ao controle positivo, mesmo sendo isolados da mesma planta e estando localizados no mesmo órgão vegetal, indicando que seriam estirpes diferentes de uma mesma espécie bacteriana.

A espécie *Lactococcus lactis* é classificada como uma bactéria ácido láctica e é a mais utilizada na produção de queijo e outros laticínios fermentados. Essa bactéria, anteriormente classificada como *Streptococcus lactis* (STACKENBRANDT; TEUBER, 1988) tem ampla distribuição na natureza, sendo encontrada principalmente nos laticínios (SALAMA et al., 1995), mas também passível de ser isolada de plantas (STARK; SHERMAN, 1935, NOMURA et al., 2006; RIGUEIRA SAMPAIO, 2015). Vários autores tiveram sucesso ao isolar essa linhagem do milho (STARK; SHERMAN, 1935; SALAMA et al., 1993; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ et al., 2008), porém não foram encontrados estudos acerca da ação desta espécie como promotora de crescimento de plantas. Bactérias ácido lácticas, dentre elas a *Lactococcus lactis*, também foram isoladas a partir de bebidas fermentadas a base de milho (DÍAZ-RUIZ et al., 2003).

Quanto à atuação da *Lactococcus lactis* como promotora de crescimento vegetal, Rigueira Sampaio (2015) demonstrou que microrganismos, dentre eles o *L. lactis* e o gênero *Bacillus* são capazes de produzir aminas bioativas através da descarboxilação de aminoácidos. Essas aminas poderiam atuar como reserva de nitrogênio nas plantas. Além disso, aminas como a espermidina e a espermina atuam, dentre outras funções, no crescimento da raiz, na senescência e na resposta da planta a patógenos (RIGUEIRA SAMPAIO, 2015), outras aminas tais quais a histamina e a serotonina apresentam efeito protetor a predadores.

Gutiérrez-Méndez et al. (2008) também obtiveram sucesso ao isolar bactérias ácido lácticas de plantas, incluindo o milho e relataram sua importância por ser uma bactéria fermentadora de lactose, apresenta atividade proteolítica e fermentação de citrato.

6. CONCLUSÃO

Foram isolados 10 espécies de bactérias todas com as habilidades de solubilização de fósforo, fixação de nitrogênio e produção de AIA sendo estas 1 isolado de *Bacillus velezensis*, 8 isolados de *Bacillus subtilis* e 1 isolado de *Lactococcus lactis*.

O estudo também deixa a possibilidade de novas pesquisas a fim de melhor entendimento da atuação das bactérias isoladas neste trabalho em diferentes culturas, uma vez que os microrganismos existentes na rizosfera não são exclusivos de nenhuma espécie vegetal, mas podem colonizar diferentes plantas.

Outra abertura existente para pesquisa é a diferenciação e completo entendimento das diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*, que foram isoladas no trabalho, o que poderia levar a melhor compreensão do por que das diferenças encontradas para a produção de ácido indol acético em cada uma das linhagens.

7. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

8. REFERÊNCIAS

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

1109

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W; MILLER, W, MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, USA, v. 215, p. 403 – 410, 1990.

1113

- ANDRADE, L.F. **Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-Anã: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético**. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2012.

1118

1119

- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, USA, v. 38, p. 145 – 180, 2000.
- ARGUESO, C.T.; HANSEN, M.; KIEBER, J.J. Regulation of ethylene biosynthesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, North Carolina, v. 26, n. 2, p. 92 – 105, 2007.

1126

- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 231 – 237, 2002.

1131

- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, M.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. 2000. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/index.html>>

1136

1137

- BALDANI, J.I.; SALLES, J.F.; OLIVARES, F.L. Bactérias endofíticas como vetores de genes de resistência a insetos. *In*: NASS, L.L., VALOIS, A.C.C., DE MELO, I.S., VALADARES-INGLIS, M.C. (eds). **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Campinas, 2000. 589 - 602.

1142

1143

1144

- 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**. v. 173, p. 29 – 37, 1995.

1146

1147

1148

- 1149 • BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health:
1150 perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied**
1151 **Microbiology and Biotechnology**. v. 84, p. 11 – 18, 2009.
- 1152
- 1153
- 1154 • BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L; MATSUI, E.; DÖBEREINER,
1155 J. The use of the 15N isotope dilution technique applied to the estimation of
1156 biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in
1157 the field. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 29, p. 924 – 929, 1983.

1158

- 1159 • BOIERO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.;
1160 LUNA, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium*
1161 *japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied**
1162 **Microbiology and Biotechnology**. v. 74, p. 874 – 880, 2007.
- 1163
- 1164

- 1165 • BRAGA, R.M.; DOURADO, M.N.; ARAÚJO, W.L. Microbial interactions:
1166 ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47,
1167 p. 86 – 98, 2016.
- 1168
- 1169
- 1170

- 1171 • BURG, S.P.; BURG, E.A. The interaction between auxin and ethylene and its
1172 role in plant growth. **Proceedings of the National Academy of Science of**
1173 **the USA**. v. 55, p. 262 – 269, 1966.

1174

- 1175 • CHAUHAN, A.; GULERIA, S.; BALGIR, P.P.; WALIA, A.; MAHAJAN, R.;
1176 MEHTA, P.; SHIRKOT, C.K. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen
1177 fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from
1178 rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect.
1179 **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 294 – 304, 2017.
- 1180
- 1181

- 1182 • CHEN, W.X.; WANG, E.T.; LI, Y.B.; LI, Y.; GAO, J.L. *Rbizobium bainanensis*,
1183 a new species of root nodule bacteria isolated from tropical region. In:
1184 **International Symposium on Diversity and Taxonomy of Rhizobia**,
1185 Wuhan, China, p. 16, 1994.
- 1186

- 1187 • CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Inoculation
1188 of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on
1189 Sorghum bicolor: root colonization and plant growth promotion of dual strain
1190 inocula. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 30, p. 81 – 87, 1997.
1191
1192
- 1193 • DA SILVA, K.; PERIN, L.; GOMES, M.L.; BARAÚNA, A.C.; PEREIRA, G.M.D.;
1194 MOSQUEIRA, C.A.; DA COSTA, I.B.; O'HARA, G.; ZILLI, J.E. Diversity and
1195 capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon
1196 region. **Acta Amazonica**. v. 46, p. 111 – 118, 2016.
1197
1198
1199
- 1200 • DA RÓZ, A.L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis.
1201 **Polímeros**. v. 13, p. 4 – 6, 2003.
1202
1203
- 1204 • DEMASON, D. A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during
1205 morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**. v. 32,
1206 p. 1432 – 2048, 2005.
1207
- 1208 • DESBROSSES, G.; CONTESTO, C.; VAROQUAUX, F.; GALLAND, M.;
1209 TOURAINE, B. PGPR-Arabidopsis interactions is a useful system to study
1210 signalling pathways invlved in plant developmental control. **Plant Signaling &
1211 Behavior**. v. 4, p. 321 – 323, 2009.
1212
1213
- 1214 • DÍAZ-RUIZ, G.; GUYOT, J.P.; RUIZ-TERAN, F.; MORLON-GUYOT, J.;
1215 WACHER, C. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic
1216 but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial
1217 diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. **Applied and
1218 Environmental Microbiology**. v. 69, p. 4367 – 4374, 2003.
1219
1220
1221
- 1222 • DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting
1223 effects of diazotrophics the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant
1224 Science**. v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.
1225
1226

- 1227 • DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. (1995) **Como isolar e**
 1228 **identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília,
 1229 Brasil.
 1230
 1231
 1232 DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. In: Stewart
 1233 D.P.; Gallon, J.R., (Ed.). **Nitrogen fixation.** London: Academic Press. 1980. p.
 1234 301 – 334.
 1235
 1236

- 1237 • DONG, Y.H.; GUSTI, A.R.; ZHANG, Q.; XU, J.L.; ZHANG, L.H. Identification
 1238 of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species.
 1239 **Applied and Environmental Microbiology.** v. 68, p. 1754 – 1759, 2002.
 1240
 1241
- 1242 • DUARTE, A.P. Característica e sistemas de produção. In: GALVÃO, J.C.C.;
 1243 MIRANDA, G.V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho.** Viçosa: UFV,
 1244 2004. p. 109 – 139.
 1245

- 1246 • ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J.W.L. Natural incidence of
 1247 endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal**
 1248 **of Microbiology.** v. 46, p. 1036–1041, 2000.
 1249
 1250
- 1251 • FERREIRA, M.C.B.; FERNANDES, M.S.; DÖBEREINER, J. Role of
 1252 *Azospirillum brasilense* nitrate-reductase in nitrate assimilation by wheat plants.
 1253 **Biology and Fertility of Soils.** v. 4, p. 47 – 53, 1987.
 1254
 1255
- 1256 • FORNASIERI, F.D.A. **Cultura do Milho.** Jaboticabal, Brasil.
 1257

- 1258 • FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum Sensing in
 1259 Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional
 1260 Regulators. **Journal of Bacteriology.** v. 176, p. 269 – 275, 1994.
 1261
 1262

- 1263 • GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria.
 1264 **Canadian Journal of Microbiology.** v. 41, p. 109 – 117, 1995.
 1265

- 1266 • GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R.C. Plant growth promoting and
 1267 rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the

- 1268 cold deserts of the Himalayas. **Current Microbiology**. v. 58, p. 371 – 377,
1269 2009.
1270
1271
- 1272 • GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-
1273 CÓRDOVA, A.F.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V.; RIVERA-CHAVIRA, B.
1274 Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose
1275 and sensory analysis. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 49 – 57, 2008.
1276
- 1277 • HALDAR, S.; SENGUPTA, S. Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere:
1278 insight and biotechnological potential. **Open Microbiology Journal**. v. 9, p. 1
1279 – 7, 2015.
1280
- 1281 • HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and
1282 analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**.
1283 v. 41, p. 95 – 98, 1999.
1284
1285
- 1286 • JACQUES, M.A.; MORRIS, C.E. A review of issues related to the
1287 quantification of bacteria from the phyllosphere. **FEMS Microbiology Ecology**
1288 v. 18, p. 1 – 14, 1995.
1289
- 1290 • KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKÉS, M.L. Non-symbiotic
1291 bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant
1292 growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**. v. 36,
1293 p. 1229 – 1244, 2004.
1294
- 1295
- 1296 • KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.;
1297 PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of
1298 soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion.
1299 **Environmental Microbiology**. v. 6, p. 1244 – 1251, 2004.
1300
- 1301 • KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary
1302 Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and**
1303 **Evolution**. v. 33, p. 1870 – 1874, 2016.
1304
- 1305 • KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Nitrogen fixation and in
1306 vitro production of indolacetic acid by endophytic diazotrophic bacteria.
1307 **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459 – 1465,
1308 2007.
1309

1310

- LALANDE, R.; BISSONNETTE, N.; COUTLEE, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. **Plant and Soil**. v. 115, n. 1, p. 7 – 11, 1989.

1314

1315

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

1320

- MANHÃES, N.E. **Bactérias promotoras do crescimento vegetal e substratos em Bromeliaceae e Cetaceae**. 2014. 164 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense “Darcy Ribeiro”, Rio de Janeiro, 2014.

1325

1326

- MARIANO R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 8, p. 121 – 137, 2000.

1330

1331

1332

- MCINROY, J.A.; KLOEPPER, J.H. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 895 – 901, 1995.

1336

1337

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

1342

1343

1344

- MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**. v. 80, p. 808 – 811, 1990.

1346

1347

1348

- 1349 • MOCALI, S.; BERTELLI, E.; CELLI, F.D.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.;
 1350 VILANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of
 1351 bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different
 1352 plant organs. **Research in Microbiology**. v. 154, p. 105 – 114, 2003
 1353
 1354

- 1355 • MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A.R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.;
 1356 SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth
 1357 promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their
 1358 inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**. v. 58, p. 21 – 28, 2012.
 1359
 1360
 1361

- 1362 • MORGAN, P.W. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of
 1363 ethylene by cotton and grain sorghum. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p. 420
 1364 – 427, 1962.
 1365

- 1366 • MURRAY, J.D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes.
 1367 **Molecular Plant-Microbe Interaction**. v. 24, p. 631 – 639, 2011.
 1368
 1369
 1370

- 1371 • NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DOBEREINER, J. Rhizobium
 1372 strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of**
 1373 **Experimental Botany**. v. 22, p. 1179 – 1192, 1985.
 1374
 1375
 1376

- 1377 • NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J. **Proceedings of the Frist International**
 1378 **Symposium on Nitrogen Fixation**. Pulmann: Washington State University
 1379 Press, p. 518 – 538, 1976.
 1380

- 1381 • NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO,
 1382 T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk
 1383 and plants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 101, p. 396 – 405, 2006.
 1384
 1385

- 1386 • OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.;
 1387 DÖBEREINER, J. Occurence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum*
 1388 spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. In: **International**
 1389 **Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of**
 1390 **Biological Nitrogen Fixation, Programe and Abstracts**. (Ed.). Seropédica,
 1391 EMBRAPA-CNPAB. 1996. p. 65 – 66.

- 1392 • ONA, O.; SMETS, I.; GYSEGOM, P.; BERNAERTS, K.; VAN IMPE, J.;
 1393 PRINSEN E.; VANDERLEYDEN, J. The effect of pH on indole-3-acetic acid
 1394 (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Symbiosis**. v. 35, p. 199 –
 1395 208, 2003.
 1396

- 1397 • PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in
 1398 development of the host plant root system. **Applied and Environmental**
 1399 **Microbiology**. v. 68, p. 3795 – 3801, 2002.
 1400
 1401

- 1402 • PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum*
 1403 with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea*
 1404 *batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum*
 1405 *vulgate*). **Biology and Fertility of Soils**. v. 11, p. 111 – 115, 1991.
 1406

- 1407 • PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGA, C.; BELLOGÍN, R.A.; DEL CERRO,
 1408 P.; ESPUNY, M.R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F.J.;
 1409 OLLERO, F.J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous
 1410 agricultural important plants: from microorganism capacities to crop
 1411 production. **Microbiological Research**. v. 169, p. 325 – 336, 2014.
 1412
 1413

- 1414 • PETRINI, L.E.; PETRINI, O.; LAFLAMME, G. Recovery of endophytes of
 1415 *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*.
 1416 **Phytoprotection**. v. 70, p. 97 – 103, 1989.
 1417
 1418
- 1419 • PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. The earliest archaeological maize (*Zea*
 1420 *mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates
 1421 and their implications. **Proceedings of the National Academy of Science of**
 1422 **the United States of America**. v. 98, p. 2101 – 2103, 2001.
 1423

- 1424 • PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHELS, K.; VANDERLEYDEN, J.;
 1425 RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Reviews in Plant**
 1426 **Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 50, p. 665 – 693, 1999.
 1427
 1428

- 1429 • QUIÑONES, B.; DULLA, G.; LINDOW, S.E. *Quorum* sensing regulates
 1430 exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas*
 1431 *syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 18, p. 682 – 693, 2005.
 1432

- 1433 • RAVEN, P.H.; EVERT, F.R.; EICHHORN, S.E. (2001) **Biologia Vegetal**. Rio
1434 de Janeiro: Brasil, 2001.
1435
1436
- 1437 • REMANS, R.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin signaling in plant
1438 defense. **Science**. v. 313, p. 171, 2006.
1439
- 1440
- 1441 • RIBEIRO, D. Processo de Harber-Bosch. **Revista de Ciência Elementar**. v.
1442 1, p. 1 – 29, 2013.
1443
- 1444
- 1445 • RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRINGENT-
1446 COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere
1447 and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**. v. 321, p. 305
1448 – 339, 2009.
1449
- 1450 • RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUEZ, A.L.; KAEPLER, S.M.; TRIPLETT,
1451 E.W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria.
1452 **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 28, p. 829 – 836, 2001.
1453
1454
1455
1456
- 1457 • RIGUEIRA, J.C.S. **Influência da contagem de células somáticas no perfil**
1458 **e teores de aminos bioativas e na qualidade de leite cru e de queijo**
1459 **mussarela**. 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) –
1460 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
1461
- 1462 • RODRIGUÉZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in
1463 plant growth promotion. **Biotechnology Advances**. v. 17, p. 319 – 339, 1999.
1464
1465
- 1466 • ROESCH, L.F.W.; DE QUADROS, P.D.; CAMARGO, F.A.O.; TRIPLETT,
1467 E.W. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen
1468 fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World**
1469 **Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 23, p. 1377 – 1383, 2007.
1470
1471
1472

- 1473 • ROSS, J.J.; O'NEILL, D.P.; SMITH, J.J.; KERCKHOFFS, L.H.J; ELLIOTT,
1474 R.C. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **Plant**
1475 **Journal**. v. 21, p. 547 – 552, 2000.
1476
- 1477
- 1478 • SALAMA, M.S.; MUSAFIJA-JEKNIC, T.; SANDINE, W.E.; GIOVANNONI, S.J.
1479 An ecological study of lactic acid bacteria: isolation of new strains of
1480 lactococcus including *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. **Journal of Dairy**
1481 **Science**. v. 78, p. 1004 – 1017, 1995.
1482
1483
- 1484 • SALEH, S.S.; GLICK, B.R. Involvement of gacS and rpoS in enhancement of
1485 the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and
1486 UW4. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 47, p. 698 – 705, 2001.
1487
- 1488 • SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A**
1489 **Laboratory Manual**. New York, USA, 1989.
1490
1491
- 1492 • SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins
1493 using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**. v. 20, p. 282 –
1494 285, 1995.
1495
1496
1497
- 1498 • SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov.,
1499 a nitrogen fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International**
1500 **Journal of Systematic Bacteriology**. v. 34, p. 451 – 456, 1984.
1501
- 1502
- 1503 • SHAHAROONA, B.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Effect of plant growth
1504 promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.)
1505 growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna*
1506 *radiata* L.). **Letters in Applied Microbiology**. v. 42, p. 155 – 15, 2006.
1507
1508
- 1509 • SILVA, G.N.; VIDOR, C. Phosphate solubilizing activity of microorganisms in
1510 the presence of nitrogen, iron, calcium and potassium. **Pesquisa**
1511 **Agropecuária Brasileira**. v. 36, p. 1495 – 1508, 2001.
1512

- 1513
1514
1515
1516
1517
- 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.
- 1518
- 1519
1520
1521
1522
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 31, p. 425 – 448, 2007.
- 1523
- 1524
1525
1526
1527
1528
- 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, 1989. p. 3 – 11.
- 1529
1530
1531
- STACKEBRANDT, E.; TEUBER, M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. **Biochimie**. v. 70, p. 317 – 324, 1988.
- 1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
- STARK, P.; SHERMAN, J.M. Concerning the habitat of *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. v. 30, p. 639 – 646, 1935.
 - SUDHAKAR, P.; CHATOPPADHYAY, G.N.; GANGWAR, S.K.; GHOSH, J.K. Effect of foliar application *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Beijerinckia* on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). **Journal of Agricultural Science**. v. 34, p. 134 – 227, 2000.
- 1542
1543
1544
1545
1546
- 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. 1994. p. 299 – 309.
- 1547
1548
1549
1550
- VAN LOON, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**. v. 119, p. 243 – 254, 2007.

1551

1552

1553

1554

1555

1556

1557

- VANDE BROEK, A.; GYSEGOM, P.; ONA, O.; HENDRICKX, N.; PRINSEN, E.; VAN IMPE, J.; VANDERLEYDEN, J. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 18, p. 311 – 323, 2005.

1558

1559

1560

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**. v. 91, p. 127 – 141, 2001.

1561

1562

1563

1564

1565

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

1566

1567

1568

- Xie, G.H., Su, B.L., Cui, Z.J. 1998. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. **Acta Microbiologica Sinica**. v. 38, p. 480 – 483.

1569

1570

1571

- YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**. v. 4, p. 1 – 4, 2009.