**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias
associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**

Bruna Durante Batista

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas

**Piracicaba
2012**

Bruna Durante Batista
Bacharel em Biotecnologia

Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Orientadora:
Prof^{fa} Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Batista, Bruna Durante

Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) / Bruna Durante Batista. - - Piracicaba, 2012.

129 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Crescimento vegetal 2. Fertilizantes 3. GFP 4. Guaraná 5. Milho
6. Rizobactérias 7. RPCP I. Título

CDD 633.15
B333p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus queridos pais Cláudio e Sandra pelo incentivo, amor e dedicação que contribuíram e fazem parte de minha formação.

Dedico

Aos meus sobrinhos queridos, Ana Cláudia, Isabela e Cauã, as minhas irmãs Amanda e Letícia e ao meu cunhado Ennio, pelo apoio e alegria que me proporcionam.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre guiando meus passos.

Aos meus pais Cláudio e Sandra pelo apoio e compreensão incondicional.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Aline Ap. Pizzirani-Kleiner pela confiança, orientação, motivação e amizade.

À Maria Carolina Quecine pelo apoio fundamental, orientação, pela prontidão em atender, pelas palavras sempre positivas e pelas sugestões nos momentos decisivos que me ajudaram muito.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelo exemplo profissional e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas queridas Maria Letícia e Sarina pela amizade, companheirismo, conselhos e pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho de laboratório e casa de vegetação.

Ao amigo Lucas Taniguti pela ajuda no meu estabelecimento em Piracicaba e ao Linnaldo pelo grande incentivo.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos professores pela contribuição em minha formação.

Ao Zezo e aos demais colegas de laboratório pela colaboração e conselhos.

Ao pessoal da UFAM e da AMBEV (Maués) e ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pelo suporte durante a coleta, colaboração e direcionamento.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate e a Mônica pelo espaço concedido e aos demais alunos do laboratório de Genética Fisiológica, em especial a Andressa, pela ajuda com as plantinhas.

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima pelas fotos de microscopia e disponibilização do laboratório.

Ao Daniel Pizzaia, pelo suporte com as fotos de microscopia.

A Fernanda Damasceno, Mirelly Alves e Carolina Lealdini pela colaboração.

À Prof^a. Claudinha pelas palavras de incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Cláudio Lopes e orientados pela disponibilização de material utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro pela disponibilização da casa de vegetação e aos alunos e técnicos de seu laboratório pelo apoio.

Aos funcionários da ESALQ pela colaboração nos testes realizados em casa de vegetação.

Aos demais que de alguma forma colaboraram com o trabalho.

Ao CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Proc.: 2011/05204-8) pelo apoio financeiro.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

(M. Teresa de Calcutá)

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Biodiversidade microbiana do solo e seu potencial biotecnológico	19
2.2 Identificação bacteriana por sequenciamento do gene 16S rDNA.....	20
2.3 A cultura do guaranazeiro	21
2.4 A cultura do milho	22
2.4.1 Fertilização em milho e seu impacto ambiental	24
2.5 Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP)	26
2.5.1 A especificidade das rizobactérias	28
2.5.2 Mecanismos relacionados com a promoção de crescimento vegetal.....	29
2.5.2.1 Produção de reguladores de crescimento vegetal.....	30
2.5.2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	32
2.5.2.3 Solubilização de fosfato inorgânico (Pi).....	33
2.5.2.4 Produção de sideróforos.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Amostragem do solo rizosférico e isolamento de rizobactérias	37
3.2 Obtenção, purificação e armazenamento de isolados de rizobactérias	38
3.3 Extração de DNA das rizobactérias.....	38
3.4 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rDNA	39
3.5 Edição e análise das sequências 16S rDNA.....	40
3.6 Análises estatísticas baseadas nos UTOs: Rarefação de Índice de Cobertura	41
3.7 Seleção de rizobactérias com potencial para promoção de crescimento em plantas	42
3.7.1 Detecção e quantificação da produção de ácido indol acético (AIA)	42
3.7.2 Fixação biológica de nitrogênio	42
3.7.3 Solubilização de fosfato inorgânico	43
3.7.4 Detecção da produção de sideróforos	44
3.8 Eficiência das rizobactérias em promover o crescimento em milho.....	45
3.8.1 Colheita e variáveis determinadas	47
3.9 Observações em microscopia eletrônica de varredura.....	48
3.10 Teste de antibiose entre as bactérias do consórcio.....	48
3.11 Transformação bacteriana	49

3.11.1 Microrganismo e plasmídeo utilizados	49
3.11.2 Transformação da linhagem RZ2MS16 com o plasmídeo pCM88	49
3.11.3 Teste de estabilidade da expressão da GFP	50
3.12 Colonização de milho pela linhagem RZ2MS16: <i>gfp</i>	50
3.12.1 Microscopia óptica de fluorescência (MOF)	51
4 RESULTADOS	53
4.1 Isolamento de rizobactérias do guaranazeiro	53
4.2 Composição da comunidade bacteriana e classificação taxonômica	53
4.3 Rarefação e Índice de Cobertura.....	55
4.4 Seleção de rizobactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal.....	56
4.4.1 Produção de AIA.....	56
4.4.2 Potencial de fixação de nitrogênio	57
4.4.3 Solubilização de fosfato inorgânico.....	58
4.4.4 Produção de sideróforos	60
4.5 Seleção final para o ensaio de promoção de crescimento em milho	61
4.6 Eficiência das rizobactérias selecionadas de promover o crescimento em milho	63
4.7 Observação em microscopia eletrônica de varredura.....	68
4.8 Análise de nutrientes.....	68
4.9 Teste de antibiose entre as bactérias do consórcio	70
4.10 Transformação da linhagem RZ2MS16 com o plasmídeo pCM88	71
4.11 Colonização de milho pela linhagem RZ2MS16: <i>gfp</i>	71
4.11.1 Microscopia óptica de fluorescência	71
5 DISCUSSÃO	73
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS.....	121

RESUMO

Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

O uso de fertilizantes minerais nas culturas, inclusive no milho, é uma prática agrícola que provoca danos ambientais e prejuízos econômicos. Uma alternativa promissora, visando melhorar a produtividade e reduzir o uso de fertilizantes, é a utilização de microrganismos benéficos associados às plantas, particularmente as rizobactérias promotoras de crescimento. Essas bactérias vivem na rizosfera e são capazes de colonizar diversos tecidos vegetais, beneficiando o desenvolvimento das plantas através de mecanismos de promoção de crescimento. Na busca por alternativas sustentáveis e mais rentáveis, o presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar, selecionar e monitorar rizobactérias associadas ao guaranazeiro da Amazônia que possuíssem características promotoras de crescimento vegetal para serem usadas como inoculantes em sementes de milho. Amostras de solo rizosférico de cinco plantas de guaranazeiros foram coletadas e foi realizado o isolamento das rizobactérias. A caracterização molecular foi realizada através do sequenciamento do gene 16S rDNA para análise da diversidade microbiana e identificação das linhagens. Avaliou-se a capacidade das linhagens de produzir ácido indol acético (AIA), fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato inorgânico e de produzir sideróforos. A análise da diversidade microbiana indicou semelhança entre a comunidade bacteriana isolada da rizosfera do guaranazeiro e a do milho encontrada na literatura. Foi observada predominância do filo Proteobacteria, sendo em sua maioria representado pelo gênero *Burkholderia*. Do total das 101 linhagens obtidas, 89% foram capazes de produzir AIA, 23% fixaram nitrogênio atmosférico, 43% solubilizaram fosfato inorgânico e 24% produziram sideróforos. Cinco linhagens foram selecionadas para o ensaio de promoção de crescimento em milho em casa de vegetação, essas foram identificadas pelo sequenciamento completo do gene 16S rDNA e compuseram os tratamentos como segue: RZ2MS9 – *Bacillus* sp. (T1), RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* (T2) e consórcio (T3) de 5 linhagens (RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans*). As análises estatísticas comprovaram que as linhagens RZ2MS9 (*Bacillus* sp.) e RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) foram eficientes como promotoras de crescimento em milho, aumentando a altura em até 39% em relação ao controle, o peso seco da parte aérea em até 234% e do sistema radicular em até 248% comparado ao controle não inoculado. A linhagem RZ2MS9 (*Bacillus* sp.) aumentou o conteúdo de Ca nas plantas inoculadas e se destacou como promotora de crescimento entre as linhagens selecionadas. Para o monitoramento da colonização da bactéria na planta, a linhagem RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) foi transformada com o plasmídeo pCM88 e passou a expressar a proteína GFP, sendo possível observar, por microscopia óptica de fluorescência, que, 12 dias após a inoculação na planta, a bactéria encontra-se concentrada no cilindro central da mesma de onde pode se inserir em algum vaso condutor e colonizar a planta sistematicamente demonstrando que a mesma se comporta como endofítica da planta de milho. Deve-se considerar a importância da exploração de plantas de clima tropical, como o guaranazeiro, como reservatórios de bactérias com enorme potencial biotecnológico. Os microrganismos nesse trabalho tem grande potencial para serem utilizados futuramente como inoculantes.

Palavras-chave: RPCP; *Bacillus*; *Burkholderia*; Guaranazeiro; Milho; GFP

ABSTRACT

Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by rhizobacteria associated with culture of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

The use of mineral fertilizers on crops, including maize, is an agricultural practice that causes environmental damage and economical losses. A promising alternative, to improve productivity and reduce fertilizer use is the use of beneficial microorganisms associated with plants, particularly the growth-promoting rhizobacteria. These bacteria live in the rhizosphere and are capable of colonizing various plant tissues, benefiting plant growth through mechanisms of growth promotion. In the search for sustainable and more profitable alternative, this study aimed to isolate, characterize, monitor and select rhizobacteria associated with Amazonian guarana that possessed characteristics of plant growth promoters for use as inoculants in maize seeds. Rhizosphere soil samples from five guarana plants were collected and the isolation of rhizobacteria was performed. Molecular characterization was performed by sequencing the 16S rDNA for analysis of microbial diversity and identification of strains. It was evaluated the ability of strains to produce indole acetic acid (IAA), fix atmospheric nitrogen, solubilize inorganic phosphate and produce siderophores. The analysis of microbial diversity indicated similarity between the bacterial community isolated from the rhizosphere of guarana and that found in the literature to maize. It was observed predominance of Proteobacteria phylum, being mostly represented by the genus *Burkholderia*. Of the total 101 strains obtained, 89% were able to produce IAA, 23% fixed atmospheric nitrogen, 43% solubilized inorganic phosphate and 24% produced siderophores. Five strains were selected for testing in growth promotion in maize under greenhouse conditions; these were identified by complete sequencing of the 16S rDNA and compose the treatments as follows: RZ2MS9 - *Bacillus* sp. (T1), RZ2MS16 - *Burkholderia ambifaria* (T2) and consortium (T3) of 5 strains (RZ1MS6 - *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 - *Burkholderia* sp., RZ2MS9 - *Bacillus* sp., RZ2MS16 - *Burkholderia ambifaria* and RZ4MS18 - *Delftia acidovorans*). Statistical analyzes showed that the strains RZ2MS9 (*Bacillus* sp.) and RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) were effective as growth promoters in maize, increasing the height by up to 39% compared to control, shoot dry weight by up to 234% and root system up to 248% compared to uninoculated control. The strain RZ2MS9 (*Bacillus* sp.) increased Ca content in plants inoculated and stood out as a promoter of growth between the strains selected. For monitoring of colonization of the bacteria in the plant, the strain RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) was transformed with the plasmid pCM88 and passed to express GFP, being possible to observe by fluorescence microscopy that, 12 days after inoculation on the plant, the bacteria is concentrated in the plant central cylinder where the same can be inserted into a vessel conductor and consistently colonize the plant, proving the endophytic life style of this strain during maize interaction. It should be considered the importance of tropical plants, like guarana, as reservoirs of bacteria with great biotechnological potential. Microorganisms in this work has great potential to be used in future as inoculants.

Keywords: PGPR; *Bacillus*; *Burkholderia*; guarana; maize; GFP

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam uma fonte quase inesgotável de recursos naturais pouco explorados na Amazônia, principalmente os que vivem em habitats específicos, como aqueles associados às plantas. Entretanto, esses organismos podem apresentar um grande valor biotecnológico além de uma alternativa para redução dos prejuízos causados ao meio ambiente.

O guaranazeiro é uma planta tropical nativa da Amazônia e que apresenta uma comunidade bacteriana associada ainda não explorada. Como as técnicas biotecnológicas começam a ficar cada vez mais disponíveis, cresce a necessidade de programas que planejem a exploração econômica da biodiversidade associada a plantas tropicais nativas do Brasil, como o guaranazeiro.

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) formam um grupo heterogêneo de bactérias benéficas que, em superfícies da raiz e em colaboração com as raízes, podem promover o crescimento da planta de maneira direta ou indireta. Atuam diretamente por meio da produção de reguladores de crescimento como o ácido indol acético (AIA), pela fixação biológica de nitrogênio, já que são capazes de assimilar o N_2 atmosférico e convertê-lo à forma assimilável (NH_3) num processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN), e ainda podem solubilizar fosfato inorgânico. Sua ação indireta ocorre por meio do controle biológico de patógenos, sendo por competição de espaço e nutrientes ou pela produção de sideróforos, privando de ferro potenciais fitopatógenos.

O milho, em função do valor nutritivo, da adaptabilidade a distintas condições edafoclimáticas e dos altos rendimentos possíveis de serem alcançados, é um dos cereais mais cultivados no mundo, assumindo grande importância social e econômica. O elevado rendimento alcançado hoje em dia nesta cultura é fruto de progressos no melhoramento de plantas por intermédio de adubação, irrigação, controle de pragas, doenças e plantas daninhas e outras práticas agrícolas. Entretanto, somente essas práticas, sem o incremento dos fertilizantes minerais aplicados na cultura, não permitiriam tão elevados rendimentos. Dentre os fatores de produção de grãos, os fertilizantes são os que representam maior valor no custo de produção e desequilíbrio nos ecossistemas naturais, o que pode limitar a obtenção de aumentos expressivos de produtividade.

A preocupação crescente com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos e com uso responsável dos recursos naturais sem que haja redução da produção. A

possibilidade da aplicação de RPCP nos solos traz benefícios diretos para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, uma alternativa de cultivo com menor uso de fertilizantes.

Visto que bactérias isoladas de uma espécie de planta podem ser eficazes, até mesmo com maior intensidade, na promoção de crescimento em uma diferente espécie de planta e em diferentes tipos de solo, os objetivos deste trabalho foram: isolar, selecionar e caracterizar rizobactérias promotoras de crescimento associadas a plantas de guaranazeiro e testar seu potencial de promover o crescimento de milho, além de realizar o monitoramento de uma linhagem que foi comprovadamente efetiva em casa de vegetação, transformando-a com o gene da *Green Fluorescent Protein* (GFP), sendo possível então observar seu comportamento ao colonizar a planta hospedeira.

As prospecções de bactérias que reúnam potenciais para desonerar custos e perdas na produção do milho, por meio da diminuição do uso de fertilizantes químicos vindo a colaborar para um sistema agrícola mais sustentável e rentável são importantes ferramentas para o desenvolvimento de estratégias de manejo da cultura e futuras formulações de produtos, como inoculantes comerciais.

A hipótese formulada para esse trabalho é de que rizobactérias isoladas do guaranazeiro apresentem atividade promotora de crescimento vegetal em milho, seja por ação direta ou indireta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiversidade microbiana do solo e seu potencial biotecnológico

A questão da biodiversidade encontra-se entre os temas ambientais de maior destaque nos últimos anos. O Brasil e outros países tropicais abrigam áreas consideradas *hotspots* da biodiversidade do planeta (MYERS et al., 2000). Tais áreas podem apresentar regiões de megadiversidade onde, uma porcentagem das espécies é ainda desconhecida para a ciência.

Os microrganismos, distribuídos em três domínios hierárquicos, *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*, apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções de suma importância na manutenção dos ecossistemas, como componentes fundamentais das cadeias alimentares e dos ciclos biogeoquímicos (MYERS, 1996; SCHIMEL, 1995). Enquanto é reconhecida a importância dos microrganismos para a funcionalidade dos ecossistemas, o impacto destes sobre a diversidade e produtividade de plantas é pobremente entendido (Van Der HEIJDEN et al., 2008; ZAK et al., 2003).

A diversidade de microrganismos é tão vasta quanto desconhecida. Estudos de diversidade microbiana estimaram em 1g de solo a presença de seis mil a cinquenta mil espécies bacterianas (Van Der HEIJEN et al., 2008). Outras estimativas sugerem, ainda, que o número de espécies de bactérias por grama de solo varia entre duas mil a oito milhões (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2007), destas, somente uma porcentagem muito baixa (cerca de 1%) é cultivável (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; GELSOMINO et al., 1999). Assim, apesar da grande importância dos microrganismos na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (CANHOS et al., 2004).

A comunidade de bactérias pode variar de acordo com o habitat em que se encontra: os gêneros de bactérias são diferentes na rizosfera, solo e rizoplane (interface do solo com a epiderme da raiz). A colonização da rizosfera irá depender da habilidade da bactéria em utilizar os diferentes exsudatos radiculares; dessa forma, a variedade de compostos orgânicos liberados pela planta é considerada por muitos autores como o principal fator responsável pela diversidade de microrganismos na rizosfera (COELHO, 2006).

Staley (1997) mostra que entre os benefícios dos estudos da diversidade microbiana, podem-se enumerar: a expansão das fronteiras do conhecimento acerca das estratégias e dos limites da vida; o enfoque da importância dos microrganismos na sustentabilidade da vida no planeta; sua utilização para o monitoramento de alterações ambientais; a compreensão do seu papel nas interações com os organismos superiores; as comunidades microbianas como

modelos para o conhecimento das interações biológicas e da história evolutiva; e sua utilização como fonte de novos produtos biotecnológicos.

Os microrganismos são as formas de vida mais antigas, diversas e abundantes sobre a Terra, compreendendo larga porção da diversidade genética presente em diferentes ecossistemas. Apesar da alta diversidade, seu impacto sobre os processos ecológicos ainda é pouco entendido. Por exemplo, estimativas conservadoras sugerem que cerca de 20 mil espécies de plantas são completamente dependentes dos microrganismos simbiotes para o crescimento e sobrevivência em ecossistemas terrestres. Microrganismos do solo são importantes reguladores da produtividade de plantas, especialmente em ecossistemas pobres em nutrientes, nos quais os simbiotes são responsáveis pela aquisição de micronutrientes para as plantas. Fungos associados a raízes (micorrízicos), bactérias fixadoras de nitrogênio e diferentes espécies de microrganismos de vida livre regulam de forma significativa o desenvolvimento e a produtividade de diferentes grupos de plantas, por meio da mineralização e/ou competição pelos nutrientes presentes no solo (Van Der HEIDJEN et al., 2008).

Como poucas plantas já foram estudadas em relação à diversidade das comunidades bacterianas associadas, existe uma grande possibilidade de se encontrar microrganismos com potencial biotecnológico nunca antes explorado (RYAN et al., 2008). A diversidade dos grupos microbianos presentes nos diferentes ecossistemas, principalmente nos tropicais, é praticamente desconhecida, e, portanto, merece maior atenção e incentivo no que se refere aos estudos de biodiversidade, importância ecológica e aplicação biotecnológica.

2.2 Identificação bacteriana através do sequenciamento do gene 16S rDNA

O sequenciamento de genes essenciais para a sobrevivência dos organismos, também chamados de genes *housekeeping*, é utilizado em estudos populacionais e de identificação. Esta aplicação está baseada no fato destes genes serem altamente conservados e possuírem diferentes domínios, alguns conservados e outros variáveis. As regiões conservadas entre as espécies são utilizadas como molde para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores tornando possível a amplificação da região por PCR enquanto as regiões variáveis permitem a distinção filogenética dos microrganismos (BARKEN et al., 2007; NOCKER et al., 2007).

Um fator vital para o crescimento, manutenção e reparo celular de todos os microrganismos é a síntese de proteínas, que depende da participação do RNA ribossômico

(rRNA) para a formação do ribossomo e tradução da informação genética. A codificação do rRNA é feita pelo chamado DNA ribossômico (rDNA) (CARVALHO NETTO, 2007).

O rDNA de bactérias é objeto de grande número de estudos, com diversas aplicações em genética, evolução e filogenia. Os genes ribossomais são considerados cronômetros evolutivos (WOESE; FOX, 1977), pois a comparação de sua sequência entre diversos organismos permite inferências filogenéticas entre os mesmos. Isto é possível dado que estes genes estão presentes em todos os seres vivos e são conservados do ponto de vista evolutivo, mas apresentam regiões com variações de nucleotídeos nas diferentes espécies, o que permite comparações mesmo entre organismos filogeneticamente distantes (CARVALHO NETTO, 2007).

O emprego de técnicas moleculares se tornou possível a partir dos estudos pioneiros de Pace et al. (1986), em análises de estrutura de comunidades microbianas utilizando as informações da sequência de nucleotídeos do gene da subunidade 16S do DNA ribossômico (16S rDNA). Este gene tem sido muito utilizado por estar presente em todas as bactérias, derivar de uma ancestral comum, além de ser geneticamente estável e apresentar um tamanho suficiente para análises filogenéticas (CHENEY et al., 2000; WOESE, 1987). O gene 16S rDNA tem sido largamente utilizado para estudos taxonômicos, pois permite a análise de sequências tanto estreitamente relacionadas quanto entre microrganismos mais distantes (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994). Dessa maneira, o sequenciamento desse gene pode permitir a identificação de microrganismos ao nível de gênero e possivelmente ao nível de espécie (CHENEY et al., 2000).

2.3 A cultura do guaranazeiro

O guaranazeiro (*Paullinia cupana*) pertence à família *Sapindaceae* e é uma planta tropical originária da Amazônia, onde os índios Saterê-Mauê a utilizam há muitos anos (KUKOSKI et al., 2005; FUKUMASU et al., 2006). Esta planta é encontrada em estado nativo nas regiões compreendidas entre os rios Amazonas, Maués, Paraná do Ramos e Negro (Estado do Amazonas) e na bacia do Rio Orinoco, na Venezuela (Superintendência da Zona Franca de Manaus - SUFRAMA, 2003).

O fruto é pequeno e redondo, negro e brilhante, assumindo uma forma de cápsula, em cujo interior há somente uma semente. Uma vez atingida a maturação completa, abre-se parcialmente, deixando à mostra o pelicarpo de cor castanha, parcialmente coberto por uma substância branca (arilo) (CORRÊA, 1984; FARIA et al., 2000).

Ducke, um dos primeiros botânicos a estudar o guaraná, classificou a espécie em duas subespécies ou variedades geográficas: *Paullinia cupana* (Kunth) var. *typica* (existente principalmente na Venezuela e Colômbia) e *Paullinia cupana* (Kunth) var. *sorbilis* [(Mart.) Ducke] (oriunda da flora brasileira) (CORRÊA, 1984). Há aproximadamente 195 espécies desse gênero distribuídas na América tropical e subtropical. Destas, pelo menos nove espécies são descritas como nativas do Brasil (ÂNGELO, 2008), que é praticamente o único país a produzir guaraná em escala comercial em cultivos racionais e sistemáticos, sendo que a maior parte proveniente do Estado da Bahia, seguido por Amazonas e Mato Grosso (SUFRAMA, 2003).

Mais de 14.000 ha de guaranazeiro estão plantados em diferentes estados do país, dos quais 6.811 ha estão situados no estado do Amazonas e 7.054 ha estão situados no estado da Bahia. A cultura e comercialização do fruto do guaranazeiro movimentam mais de 3.000 pequenos produtores só na região de Maués - AM e emprega direta e indiretamente milhares de amazonenses (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2011; NASCIMENTO FILHO; ATROCH, 2002).

Da produção de sementes de guaraná torradas no país, 70% é absorvida pela indústria de refrigerante (na forma de xarope) e os 30% restantes abastecem o mercado interno e externo (CAMARGO et al., 2006).

O rendimento das sementes é de 70%, sendo a forma seca e levemente torrada a única apropriada para consumo (MORAES et al., 2003; MAJHENIC et al., 2007; Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - SBRT, 2008) e de acordo com o Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental (2008) são comercializadas de quatro diferentes formas: guaraná em rama (grão torrado), guaraná em bastão (guaraná em rama triturado e pilado, moldado em formato de bastão, seco e defumado), guaraná em pó (grão torrado e moído) e xaropes (produto exclusivo de indústrias de considerável tecnologia e nível de capitalização).

Seu valor é reconhecido por suas propriedades estimulantes e medicinais, sendo empregados na indústria farmacêutica e na fabricação de refrigerantes, xaropes, sucos, pó e bastões. Além disso, são atribuídos ao guaraná, entre outras, propriedades estimulante, afrodisíaca, diurética, antitérmica, antineurálgica, analgésica e antigripal. Chás de guaraná, comprimidos, sachês, vêm sendo exportados para vários países entre eles, o Japão, França, Reino Unido e os Estados Unidos (CORRÊA, 1984; POLTRONIERI et al., 1995).

O guaranazeiro possui uma diversidade bacteriana associada até pouco tempo desconhecida. Somente a partir do ano de 2009, com o projeto “Microrganismos associados

ao guaranazeiro com potencial biotecnológico e agrícola, especialmente visando o controle da antracnose” (Processo n. 09/53376-2) que foi aprovado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado São Paulo) em parceria com a FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas), foi realizado um levantamento da diversidade de seus microrganismos associados (endofíticos, epifíticos (BONATELLI, 2012) e, no presente trabalho, de rizobactérias associadas ao guaranazeiro). Portanto, o mesmo apresenta também um potencial biotecnológico para investigação de novos produtos praticamente inexplorado. Como as técnicas biotecnológicas começam a ficar cada vez mais disponíveis, cresce a necessidade de programas que realizem o mapeamento da biodiversidade e planejem a preservação e exploração econômica de plantas tropicais nativas do Brasil e seus microrganismos associados.

Considerando a falta de informações sobre a microbiota encontrada no guaranazeiro e todo o potencial que pode ser explorado dessa cultura, fica clara a necessidade de estudos biotecnológicos para a sua potencial utilização nas indústrias e agricultura.

2.4 A cultura do milho

O milho pertence à classe *Liliopsida*, família *Poaceae*, gênero *Zea*, sendo classificado cientificamente como *Zea mays* L. Os primeiros registros do cultivo do milho datam de 7.300 anos atrás, e foram encontrados em pequenas ilhas próximas ao litoral do México. Seu nome, de origem indígena caribenha, significa "sustento da vida" e foi a alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos. A domesticação ocorreu a partir de um ancestral selvagem, o teosinte. Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo e do arroz (MILHO, 2010).

O milho tem um alto potencial produtivo e é bastante responsivo à tecnologia, sendo também a espécie vegetal mais utilizada em pesquisas genéticas. É um dos principais casos de sucesso da chamada revolução verde (MILHO, 2010). Além disso, é uma planta C4, sendo extremamente eficiente na conversão de CO₂, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz (ALVES, 2007).

De maneira geral, os maiores acréscimos na produtividade de milho estão associados ao incremento na quantidade de fertilizantes aplicados, e na busca por maiores eficiências de utilização das novas tecnologias (VORPAGEL, 2010). Embora seja um produto de grande importância para o agronegócio, praticamente toda a produção brasileira de milho é consumida internamente, sendo que, cerca de 70 a 80% é destinada à cadeia produtiva de

suínos e aves (DUARTE et al., 2002), para o preparo de rações, uma pequena parte vai para a produção de óleo comestível, e o restante é utilizado na fabricação de produtos básicos que compõem a alimentação de um contingente enorme de pessoas, especialmente aquele estrato de baixa renda, localizado no semi-árido nordestino. O milho é ainda comumente empregado na forma *in natura* na alimentação humana, como milho verde, na forma de subprodutos, como pão, farinha, massas (CANTARELLA, 1993) e atualmente na produção de etanol (ALVES, 2007).

Na evolução mundial da produção do milho, o Brasil se destaca como o terceiro maior produtor, sendo superado apenas pelos Estados Unidos e China. No período de 2010/2011 sua produção mundial ficou em torno de 821 milhões de toneladas, sendo que desses, 39% foram produzidos pelos Estados Unidos, 21% pela China e 6,7% pelo Brasil. A produtividade média nacional da cultura do milho é cerca de 5000 kg.ha⁻¹ (United States Department of Agriculture - USDA, 2012).

A previsão de área cultivada total na safra brasileira de 2011/2012 deverá ficar entre 14.184,3 e 14.476,7 mil hectares, alcançando aproximadamente 500 mil hectares a mais que a área da safra passada (13.838,7 mil ha). E a produção brasileira esperada deverá situar-se entre 57.327,0 e 58.989,3 mil toneladas, com variação de (-3) e 2,6% em relação à safra passada, quando foram colhidas 57.514,1 mil toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2012).

2.4.1 Fertilização em milho e seu impacto ambiental

A agricultura tem uma função de grande relevância na conquista do desenvolvimento sustentado. Fertilizantes ‘químicos, ‘artificiais’ ou ‘sintéticos’, por sua vez, têm desempenhado, por mais de 150 anos, um papel fundamental no desenvolvimento da agricultura e no atendimento das necessidades nutricionais de uma população continuamente crescente. De fato, os fertilizantes podem ser responsáveis por cerca de um terço até metade da produção agrícola (BROWN, 1995).

A principal função dos fertilizantes é suplementar a disponibilidade de nutrientes naturais do solo com a finalidade de satisfazer à demanda de culturas que apresentam um alto potencial de produtividade, tornando as produções economicamente viáveis (PUGGINA, 2000). Dentre os fatores de produção de grãos, os fertilizantes são os que representam maior

valor no custo de produção do milho, sendo o mais limitante para obtenção de aumentos expressivos de produtividade (NICOLINI, 2009).

O Nitrogênio é o nutriente absorvido em maior quantidade pelo milho, que mais influencia seu rendimento de grãos e mais onera o custo de produção da cultura (ARAÚJO et al., 2004; SANGOI; ALMEIDA, 1994; SILVA et al., 2005). As doses de nitrogênio indicadas para essa cultura, segundo Amado et al. (2002), podem alcançar valores superiores a 150 kg.ha⁻¹, podendo esses valores variar conforme a quantidade de matéria orgânica presente no solo.

Entretanto, a adubação nitrogenada de culturas não-leguminosas é um dos insumos mais caros, e impactantes ao meio ambiente, na agricultura. Aproximadamente 65% do nitrogênio mineral aplicado são perdidos no sistema solo-planta através das emissões gasosas, escoamento, erosão e lixiviação. O impacto ambiental das perdas varia de: efeito estufa, diminuição do ozônio estratosférico, chuvas ácidas, mudanças no ciclo de N global e a eutrofização das águas superficiais e subterrâneas (BHATTACHARJEE et al., 2008). Outro fator importante no elevado custo ambiental e de produção do fertilizante nitrogenado está na sua dependência de combustível fóssil para sua síntese, o que torna alvo das crises do petróleo (RAPPEL; LOIOLA, 1993).

O fósforo apresenta efeitos diretos e indiretos sobre a vegetação. Seu aumento tem efeito positivo na quantidade e qualidade das produções agrícolas (efeitos diretos). Através dos efeitos das interações indiretas, o fósforo aumenta as respostas do nitrogênio e do potássio nas produções agrícolas e tem efeitos positivos na fixação de nitrogênio, na manutenção da matéria orgânica, na capacidade de retenção de umidade, no controle da erosão e em outras propriedades físicas e químicas do solo. Todos esses efeitos positivos resultam em aumento da produção agrícola, produtividade contínua e conservação do solo (BANNANTE, 1998).

A adubação fosfatada, para a cultura do milho, é uma prática dispendiosa. O suprimento inadequado de fósforo nos estágios iniciais de desenvolvimento da cultura causa impactos negativos sobre importantes componentes de produção da cultura, tais como: redução do número de espigas e diminuição da produtividade de grãos (MENGEL; KIRKBY, 1987).

Embora a exigência do milho em fósforo não seja grande, devido às condições de solo existentes no Brasil, a disponibilidade deste nutriente é baixa. A maioria dos solos brasileiros é altamente intemperizada, apresentando alta capacidade de retenção desse nutriente em formas pouco disponíveis às plantas (NOVAIS et al., 2007). Estima-se que aproximadamente 75% do P aplicado sejam sorvidos nas partículas do solo (RAIJ, 2004), resultando numa

eficiência agronômica inferior a 20% (ARAÚJO et al., 2003; RAMOS et al., 2009). Em razão disso, há necessidade de aplicações frequentes de fertilizantes fosfatados para proporcionar e manter alta produtividade (PINOTTI; GODOY; MANJI, 2012).

O impacto causado por fertilizantes fosfatados no meio ambiente está relacionado com problemas de eutrofização, que pode ser causada por fósforo mesmo em concentrações muito baixas. Ignorando a remoção pelas culturas, os caminhos primários de perda de fósforo do solo são a erosão (vento e água) e o escoamento superficial (PUGGINA, 2000).

Com a necessidade de um aumento da produtividade agrícola sustentável no país, visando reduzir os impactos ambientais e os altos custos dos fertilizantes utilizados na cultura do milho, torna-se primordial o avanço científico nos estudos de novas estratégias de suplementação agrícola. Uma das alternativas é o uso de bioinoculantes produzidos a partir de Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP) visando à redução ou substituição do uso de produtos químicos sintéticos (CASTRO; MELO, 2007; SHAHAROONA et al., 2008), trazendo benefícios diretos para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, uma alternativa de cultivo com menor uso de insumos agrícolas (SCHROTH; HANCOCK, 1982) o que leva a um menor desequilíbrio ecológico.

O investimento em tecnologias ambientalmente corretas, economicamente viáveis, com alta eficácia agronômica e com excelentes perspectivas para que venham a contribuir com o uso racional de fertilizantes químicos é, sem dúvida, uma das diversas práticas de aproveitamento dos recursos disponíveis que contribuem com a agricultura altamente produtiva e sustentável.

2.5 Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP)

Rizosfera é a zona ao redor da raiz que se encontra sob influência imediata do sistema radicular e que vai desde sua superfície até uma distância de 1 a 3 mm (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esta é uma região rica em exsudatos, secreções e fragmentos celulares advindos da raiz. Estes compostos incluem água, ácidos orgânicos, ácidos graxos, esteróis, fatores de crescimento, nucleosídeos, açúcares, aminoácidos e vitaminas, o que torna esta uma região rica em nutrientes. Ela desempenha importante papel nos ciclos de nutrientes assim como na manutenção da saúde e estímulo do crescimento da planta (BAIS et al., 2006; BERG et al., 2005; NEHL; KNOX, 2006; SILVEIRA; FREITAS, 2007). O crescimento e atividade microbianos são intensos na rizosfera porque os compostos orgânicos liberados pelas raízes

podem ser utilizados como fonte de energia e carbono. Aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes é ocupada por estas células microbianas. As bactérias do solo formam um grupo de microrganismos que apresenta maior abundância e diversidade entre as espécies (BAREA et al., 2005).

Bactérias que se associam às plantas, colonizando suas raízes, são denominadas rizobactérias, e podem ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal: benéficas, deletérias ou neutras (GRAY; SMITH, 2005; DOBBELAERE et al, 2003). Aquelas que estabelecem uma associação benéfica com as plantas têm sido isoladas, multiplicadas, formuladas e utilizadas como prática agronômica rotineira em alguns países, favorecendo o desenvolvimento e a produtividade das plantas (LUZ, 1996).

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) formam um grupo heterogêneo de bactérias benéficas que, em superfícies da raiz e em colaboração com as raízes, podem promover o crescimento da planta. Nas últimas décadas, bactérias que incluem espécies de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Burkholderia* têm sido reportadas por promover o crescimento de plantas (GLICK, 1995; KLOEPPER et al., 1991; OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994). Nos últimos anos, vem sendo estudado e demonstrado que várias culturas podem ser colonizadas por bactérias diazotróficas, como por exemplo, plantas de milho associadas com *Burkholderia unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), arroz com *Serratia marcescens* (GYANESHWAR et al., 2001), trigo com *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera* (SALA et al., 2008) e sorgo e cana-de-açúcar com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (MEDEIROS et al., 2006; LUNA et al., 2010). Os efeitos desses microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos e incluem efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas e crescimento das plantas (FIGUEIREDO et al., 2010)

A possibilidade da aplicação de RPCPs nos solos traz benefícios diretos para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, uma alternativa de cultivo com menor uso de insumos agrícolas (LAVIE; STOTZKY, 1986; FIGUEIREDO et al., 2009)

Recentemente Gray e Smith (2005) propuseram novos conceitos para se classificar ou dividir as RPCPs :

iRPCPs – bactérias que residem dentro das células das plantas, produzindo nódulos, estruturas especializadas na fixação de nitrogênio em leguminosas. Atualmente, as bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas deste grupo, mas existem outros gêneros bacterianos de solos que pertencem a essa categoria, como: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*.

eRPCPs – bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, não produzindo nódulos, mas com capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas. Podem ser incluídas nesta categoria as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*.

Segundo Luz (2001a; 2001b), a microbiolização de sementes é uma alternativa para tratamento de sementes de milho no Brasil para o controle de vários patógenos e também como promotora de emergência e crescimento de plantas (DEY et al., 2004; SARAVANAKUMAR et al., 2007).

A promoção de crescimento leva ao aumento na produção de grãos e ao crescimento da planta, que podem ser expressos tanto pela massa da matéria seca da parte aérea ou raízes, como pela altura (COELHO et al., 2007).

2.5.1 A especificidade das rizobactérias

A interação entre linhagens de rizobactérias e plantas é estudada e aparentemente não existe consenso sobre o assunto (BOTELHO et al., 2006; FREITAS, 2007). Apesar de alguns autores não considerarem a especificidade bactéria-hospedeiro como essencial para a promoção de crescimento (QUADTHALLMANN; KLOEPPER, 1996; SHISHIDO; CHANWAY, 1998), outros pesquisadores enfatizam a importância dessa especificidade (ENEBAK et al., 1998; SRINATH et al., 2003).

Na literatura existem exemplos demonstrando que a mesma estirpe de rizobactéria pode ser eficaz em diferentes espécies de plantas, tipos de solo e regiões (ANTOUN; PRÉVOST, 2005). Os resultados obtidos por Melo e Valarini (1995) indicam que as rizobactérias isoladas de plantas de feijoeiro e cenoura não apresentaram especificidade de ação para biocontrole de *Fusarium solani* (Mart.) em pepino. Gomes et al. (2003) utilizaram *Bacillus pumilus* e *Bacillus thuringiensis* obtidos da rizosfera de couve e observaram que os isolados promoveram crescimento significativo em plantas de alface, evidenciando que não houve especificidade. As bactérias facilmente podem colonizar espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade e promover-lhes o crescimento (CERIGIOLI, 2005).

Melo et al. (2002) demonstraram falta de especificidade dos isolados de *Bacillus* quanto à promoção do crescimento. Isolados provenientes de couve, feijão e rabanete promoveram o crescimento em mudas micropropagadas de abacaxi. García et al. (2003)

observaram que um isolado de *Pseudomonas fluorescens* obtido de *Lupinus albus* colonizou a rizosfera de plantas de pimenta e nela se desenvolveu.

Gomes et al. (2003) verificaram que *Bacillus pumilus* e *Bacillus thuringiensis* obtidos da rizosfera de couve promoveram crescimento significativo em plantas de alface, evidenciando que não houve especificidade para o hospedeiro.

Uma linhagem de *Pantoea agglomerans* (33.1) isolada de *Eucalyptus grandis* promoveu o crescimento de cana-de-açúcar. Sua colonização cruzada foi observada através de técnicas de microscopia, reisolamento e qPCR (QUECINE et al., 2012).

O número de células do isolado F113 de *P. fluorescens* na rizosfera de alfafa foi semelhante ao encontrado nas rizosferas de tomate e ervilha e, principalmente, em beterraba açucareira, espécie a partir da qual a bactéria foi inicialmente isolada. Isso indica que a bactéria pode colonizar uma ampla faixa de hospedeiros, não existindo, dessa forma, especificidade para um único hospedeiro (VILLACIEROS et al., 2003).

2.5.2 Mecanismos relacionados com a promoção de crescimento vegetal

Os processos pelos quais as RPCP promovem o crescimento das plantas parecem envolver um ou mais mecanismos de ação, exercidos de forma direta, por meio da produção de substâncias promotoras do crescimento e do aumento da disponibilização de nutrientes à espécie vegetal, ou indiretamente, através da supressão de fitopatógenos na rizosfera (FREITAS, 1994; BRINGHURST, 2001). As RPCP, tanto de vida livre quanto endofíticas, podem beneficiar as culturas por meio de mecanismos de promoção de crescimento de plantas, e algumas são capazes de apresentarem mais de um mecanismo (AHMAD et al., 2008).

A promoção direta do crescimento por RPCP envolve fornecimento de substâncias como reguladores do crescimento de plantas como ácido indol acético (AIA), giberelinas, citocininas, etileno, aminoácidos (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1993; GLICK, 1995; GONZALEZ-LOPEZ et al., 2005) e o aumento da disponibilização de nutrientes ocorre pela fixação biológica de nitrogênio (BODDEY; DÖBEREINER, 1995) e solubilização de fosfato mineral e outros nutrientes (DE FREITAS et al, 1997; GAUR, 1990).

A promoção indireta do crescimento por RPCPs ocorre pela supressão de microrganismos patogênicos na rizosfera pela produção de β -1,3-glicanase (FRIDLENDER et al., 1993), antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 1997), ácido cianídrico (OWEN; ZDOR, 2001) e sideróforos (PIDELLO, 2003). Essa promoção de crescimento de plantas pela

diminuição da incidência de doenças pode ocorrer pela inibição direta do crescimento do patógeno (OWEN; ZDOR, 2001) e pela indução de resistência sistêmica da planta (FRIDLENDER et al., 1993; NANDAKUMAR et al., 2001), entre outras maneiras.

Independentemente dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, as RPCPs têm que colonizar a rizosfera em volta das raízes, o rizoplane (superfície da raiz) ou a raiz (dentro dos tecidos radiculares) (FARINA, 2012). A colonização da bactéria na rizosfera é essencial para o estabelecimento e o desenvolvimento das comunidades microbianas associadas às raízes. A mobilidade, a rápida taxa de crescimento e a aderência radicular são características importantes para tornar a colonização eficiente (FREITAS, 2007).

2.5.2.1 Produção de reguladores de crescimento vegetal

Entre os mecanismos utilizados por bactérias promotoras de crescimento, destaca-se a produção de fitormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas (GRAY; SMITH, 2005).

As auxinas, do grego ‘crescer’, são uma classe de fitohormônios capazes de afetar o crescimento vegetal e, podem ser produzidas por plantas (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1998), bactérias (BAREA et al., 1976) e fungos (DVORNIKOVA; AKRIABIN; SUVOROV, 1970). As auxinas promovem o crescimento de raízes e caules de maneira rápida (aumentando a elongação celular) ou de maneira lenta (através da divisão e diferenciação celular) (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A produção de reguladores de crescimento traz inúmeros benefícios à planta hospedeira, como expansão do sistema radicular, que melhora a absorção de água e nutrientes, acentuando sua chance de sobrevivência no ambiente (SILVEIRA, 2008).

Entretanto, altas concentrações de hormônios podem causar a inibição da elongação celular afetando o desenvolvimento das raízes em algumas culturas (BROEK et al., 1999). A sensibilidade das células à auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível à auxina que a raiz (TAIZ; ZEIGER, 2004; MARCHIORO, 2005). Uma vez que fitormônios podem ser benéficos em concentrações mais baixas, mas podem ser prejudiciais em concentrações mais altas (ANTOUN et al., 1998), seu papel na promoção do crescimento deve ser mais complexo do que normalmente seria esperado (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

Existem vários tipos de auxinas, entre elas, o ácido indol-acético (AIA) (BROEK et al., 1999). A habilidade de sintetizar estes fitormônios é amplamente distribuída entre

bactérias associadas com plantas (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003); sendo estas potencialmente utilizadas para a promoção do crescimento vegetal de plantas de muitas culturas (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1998) ou na supressão do crescimento de ervas daninhas (KENNEDY, 1995).

Após inoculação da planta com algumas RPCPs, podem ocorrer dois efeitos relacionados à auxina: o primeiro é direto, devido à produção do AIA pelos microrganismos na rizosfera; o outro devido ao estímulo à síntese desse hormônio pela própria planta (GAUDIN et al., 1994).

Zakharova et al. (1999) verificaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera são capazes de produzir AIA. Considerando que esta substância não funciona como um hormônio em células bacterianas, esta habilidade pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta (PATTEN; GLICK, 2002). Bactérias endofíticas dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xantomonas* podem promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios (PATTEN; GLICK, 1996). Nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas, a inoculação de rizóbios produtores de AIA pode aumentar a velocidade da germinação das sementes inoculadas, como observado em arroz e alface (PALANIAPPAN et al., 2010; SCHLINDWEIN et al., 2008; VARGAS et al., 2009).

Inúmeras bactérias também são capazes de sintetizar AIA e promover o crescimento em plantas, tais como: *Azospirillum brasiliensis*, *A. lipoferum* (KUSS et al., 2007), espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* (BENEDUZI et al., 2008; RATÓN et al., 2011); *Providencia* (RANA et al., 2011); *Pseudomonas fluorescens* (HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2008) e *Burkholderia* sp. (HALDA-ALIJA, 2003).

Há evidências de que um microrganismo pode selecionar uma rota em particular para a biossíntese de AIA, dentre as várias que possui, de acordo com o ambiente. A maioria delas ocorre via triptofano (PATTEN; GLICK, 1996).

Sabe-se que o aminoácido L-triptofano (LTrp) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e microrganismos, e que a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase - EC 4.1.1.74) é a enzima-chave para a biossíntese deste fitormônio (LEBUHN; HARTMANN, 1993). A produção e a concentração de triptofano nos exsudatos das raízes variam com as espécies de plantas (PATTEN; GLICK, 1996).

2.5.2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

Além do carbono e hidrogênio, o nitrogênio é um nutriente abundante na matéria viva, participando da composição de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos, entre outras (HUBBEL; KIDDER, 2003). Entretanto, apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza, este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável e, portanto, sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação (BRILL, 1977).

Na reação de redução do N_2 atmosférico a amônia requer energia de ativação alta, e não ocorre espontaneamente. Na indústria o processo de fixação de N emprega como catalisador o ferro, temperaturas entre 300 a 500° C e altas pressões. Na natureza alguns poucos microrganismos diazotróficos, ou fixadores de N tem a capacidade de reduzir o N_2 atmosférico à amônia, processo chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (SILVA et al., 2004).

Na fixação biológica de nitrogênio (FBN), bactérias diazotróficas, que possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, transformam o N_2 em amônia, subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas. O processo de FBN geralmente ocorre por meio de bactérias do gênero *Rhizobium*, que em contato com as raízes de leguminosas, formam nódulos que disponibilizam o nitrogênio atmosférico às plantas. Enquanto a bactéria disponibiliza o nitrogênio para a planta, esta fornece exsudados ricos em carbono (NEVES; RUMJANEK, 1998).

Além de *Rhizobiaceae*, outras espécies diazotróficas têm sido descobertas, não apenas associadas a leguminosas ou a raízes, mas associadas a outras partes de plantas como colmos, associadas às gramíneas ou até de vida livre no solo (ASSUMPÇÃO, 2008; QUECINE et al., 2012)

Espécies de *Burkholderia* e *Herbaspirillum* têm sido isoladas da rizosfera e do interior de tecidos vegetais de várias culturas no Brasil. Em um estudo de inoculação com *Burkholderia* em plantas de arroz, Baldani et al. (2000) relataram que a biomassa da planta aumentou 69%, e que 31% foi devido ao processo de FBN. Alves (2007) verificou que a inoculação de estirpes dos gêneros *Burkholderia* e *Herbaspirillum* contribuiu com até 34% do N absorvido em plantas de milho.

Em termos globais, estima-se que a FBN contribua com 65% da entrada anual de N na terra, enquanto que a produção industrial contribui com 24% e a fixação não biológica com cerca de 10% (HUNGRIA et al, 2001). O alto custo de fertilizantes nitrogenados encarece a produção agrícola. No entanto, o Brasil é o país no mundo que demanda, em média, a menor dose de fertilizantes nitrogenados, pois, mesmo com os solos pobres em nitrogênio, o elevado custo deste insumo impede a sua utilização de forma ideal (DÖBEREINER, 1997). Devido a esses fatores, associados à conscientização ecológica sobre o uso intensivo de agroquímicos, o potencial da FBN tem sido alvo de atenção (NEVES; RUMJANEK, 1998).

No Brasil, a FBN diminuiu significativamente o uso de fertilizantes nitrogenados a partir do desenvolvimento de inoculantes com linhagens de *Rhizobium* (ALVES; DODDEY; URGUAGA, 2003), onde até 94% do nitrogênio requerido pode ser disponibilizado por meio da FBN (HUNGRIA et al., 2006).

Deste modo, o custo da produção e conservação ambiental tem alavancado a busca de meios a serem empregados para reduzir a dependência da fertilização, especialmente a nitrogenada na agricultura (BHATTACHARJEE et al., 2008). Neste contexto, ocorreu um aumento nos estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio, a partir da década de 70, onde pesquisadores passaram a se empenhar em compreender a FBN (MARX, 2004). Os estudos de novas tecnologias que venham oferecer independência de fertilizantes nitrogenados permitirão o desenvolvimento de uma agricultura que possa garantir o abastecimento de alimentos no futuro, com menos manipulação gênica (BHATTACHARJEE et al., 2008) e o melhor aproveitamento do N atmosférico a partir da FBN (GRAHAM; VENCE, 2003).

2.5.2.3 Solubilização de fosfato inorgânico (Pi)

Depois do nitrogênio, o fósforo é o nutriente mais limitante para o desenvolvimento das plantas, onde apresenta função estrutural (BARROTI; NAHAS, 2000; GYANESHWAR et al., 2002) e de maturação dos frutos (GARCÍA, 1993), constituindo cerca de 0,2% do peso seco das plantas. É um componente estrutural de macromoléculas, como ácidos nucleicos, e fosfolípidios, e também da adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas tais como inúmeras etapas das vias C3 e C4 do ciclo de Calvin e da glicólise (MARTINS, 2004). O fósforo é um elemento essencial para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas, pois melhora todo o sistema radicular e, conseqüentemente, a parte aérea (GONÇALVES et al., 2000). Em estágios mais avançados do

crescimento, a falta de fósforo pode levar a atrofia dos caules e morte das folhas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

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), sendo que 30% a 50% do P total do solo são de origem orgânica (REIS et al., 2008) como componente de proteínas, aminoácidos e ácidos graxos, que para serem absorvidos pelas plantas necessitam ser metabolizados (FORNASIERI FILHO, 1992; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

Apesar dos solos serem ricos em fósforo, apenas uma pequena parte é disponível para as plantas, uma vez que a maior parte do fósforo é encontrada em formas insolúveis, e as plantas são capazes de absorvê-lo apenas em formas solúveis. De acordo com Braga et al. (1991), os solos brasileiros são geralmente carentes em fósforo. Nos diversos sistemas de produção agrícola, principalmente nos tropicais, são necessárias aplicações de fósforo inorgânico (Pi) no solo para garantir a produtividade. A recuperação do fósforo durante o ciclo da produção é limitada. Cerca de 80% do total de Pi aplicado no solo torna-se indisponível para as plantas, sendo imobilizado, adsorvido e/ou transformado em uma forma orgânica. A dinâmica do P no solo é complexa, este nutriente pode ser adsorvido nos hidróxidos de Fe e Al e sua retenção também se dá pela precipitação com estes elementos (Fe e Al) em solos ácidos e com Ca em solos alcalinos (GYANESHWAR et al., 2002; REICHARDT; TIMM, 2004).

Dessa forma, a disponibilidade de Pi e a eficiência da adubação fosfatada são reduzidas em solos tropicais, que geralmente apresentam altos teores de hidróxidos de Fe e Al e alta atividade de Al^{3+} (NOVAIS; SMYTH, 1999). Portanto, muitos tipos de solos são deficientes em fósforo livre (a forma disponível para as plantas), e mesmo em solo férteis é encontrado em baixíssimas concentrações (0,1 a 1,0 mg.L⁻¹ de H₂PO₄⁻).

Alguns microrganismos podem ser utilizados para aperfeiçoar o aproveitamento do nutriente, uma vez que solubilizam o fosfato, tornando-o disponível para a planta absorvê-lo (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Dentre esses microrganismos encontram-se as bactérias solubilizadoras de fosfato, que participam do ciclo do fósforo facilitando a conversão de formas insolúveis para solúveis por meio da secreção de ácidos orgânicos e fosfatases (KIM; JORDAN; MCDONALD, 1998), tornando-o disponível para a planta (GYANESHWAR et al., 2002). O principal mecanismo de ação na solubilização de fósforo mineral é por meio dos ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos (OLIVEIRA et al., 2003). Dessa maneira,

em solos, a solubilização de fosfato por bactérias é responsável por frações que variam de 1 a 50% do total de fosfato disponível as plantas, enquanto que a solubilização de fosfato por fungos representa de 0,5 a 0,1% do total. A alta proporção de microrganismos solubilizadores de fosfato está concentrada na rizosfera por ser uma região metabolicamente muito ativa e, que possui diversas fontes de fosfato, dependendo de cada tipo de rizosfera (VAZQUEZ et al., 2000). As populações de solubilizadores incluem bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, entre outras (RODRIGUEZ et al., 2006).

Mesmo a diversidade de bactérias solubilizadoras de fósforo presentes no solo sendo grande, os níveis populacionais geralmente são baixos, ocorrendo competição com outras bactérias comumente associadas à rizosfera. Para que a quantidade de fósforo liberado por esses organismos seja suficiente para promover o crescimento vegetal, deve-se promover a inoculação desses organismos em concentrações elevadas (OLIVEIRA et al., 2003).

A utilização de microrganismos solubilizadores de fósforo é uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para o melhor aproveitamento do fósforo já existente no solo (SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

2.5.2.4 Produção de sideróforos

O Ferro é o segundo metal (após o alumínio) e o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre (CRICHTON; WARD, 1995). Todos os organismos vivos necessitam de ferro para seu crescimento e para realizar o metabolismo essencial a sua existência. Nos microrganismos, o ferro é cofator de muitas enzimas, e naqueles que crescem em condições aeróbicas, o ferro é responsável pela redução do oxigênio durante a síntese da ATP, além de desempenhar um papel importante em muitas interações bactéria-plantas (MILA; SCALBERT; EXPERT, 1996; NEILANDS, 1995; van VLIET et al., 1998).

Porém, este nutriente essencial, o ferro, não está prontamente disponibilizado em ambientes aquáticos, terrestres ou em hospedeiros animais. Em solos com valor de pH próximo ou acima de 6, encontra-se na forma oxidada (Fe^{3+}), que se precipita e não é absorvida pelos vegetais (FROEHLICH; FEHR, 1981). Assim, os microrganismos têm desenvolvido várias estratégias para adquirir ferro e, ao mesmo tempo, proteger-se dos seus efeitos tóxicos potenciais (GUERINOT, 1994; REIGH; O'CONNELL, 1993). A concentração de pelo menos 1mM de ferro é necessária para um crescimento ótimo da maioria das espécies

microbianas (NEILANDS, 1995), e em condições limitantes de ferro, alguns microrganismos produzem moléculas de sideróforos (GRUSAK et al., 1999).

Sideróforos (do Grego: “carregadores de ferro”) são moléculas sequestradoras de ferro de baixo peso molecular e elevada afinidade pelo substrato, como por exemplo, a enterobactina, secretadas por microrganismos em resposta à baixa disponibilidade de Fe^{+3} em solução. Apesar de, por definição, os sideróforos possuírem altas afinidades por ferro, muitos podem formar também complexos relativamente estáveis com cobre, alumínio, molibdênio e alguns outros elementos (BENITE et al., 2002). Esses compostos atuam do lado externo da membrana celular, capturando moléculas de ferro em solução e ligando-se especificamente a receptores do complexo localizados na membrana, por onde são absorvidos, tornando assim o ferro absorvido disponível para o crescimento dos vegetais. Esses compostos atuam como promotores de crescimento pela capacidade de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, sequestrando a maioria do Fe^{+3} disponível, desta forma facilitando o crescimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2003).

Há muito tempo já se comprovou que isolados do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* podem promover o crescimento vegetal por privar de ferro potenciais fitopatógenos (KLOEPPER et al., 1980).

Os patógenos são sensíveis à ação de sideróforos por varias razões: (a) não produzem sideróforos por si próprios; (b) são incapazes de usar sideróforos produzidos por antagonistas ou por outros microrganismos em seu ambiente; (c) produzem poucos sideróforos e/ou sideróforos com baixa afinidade por ferro, em relação aos produzidos pelos antagonistas; (d) produzem sideróforos que podem ser utilizados pelos antagonista, mas são incapazes de utilizar aqueles produzidos pelos antagonistas (BUYER; LEONG, 1986; LEONG, 1986; MAGAZIN et al., 1986; SHER; BAKER, 1982; SCHROTH; HANCOCK, 1982).

A maioria dos pesquisadores trabalha hoje com a hipótese de benefício resultante da produção de sideróforos (CATTELAN et al., 1999), seja pelo controle biológico de fitopatógenos (RAMAMOORTHY et al., 2001), seja – mais raramente – pelo efeito na nutrição das plantas (RENGEL et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem do solo rizosférico e isolamento de rizobactérias

A coleta de solo rizosférico de *Paullinia Cupana* (Figura 1) foi realizada no mês de novembro/2010 na Fazenda Santa Helena pertencente à AMBEV (colaboradora do projeto) localizada no município de Maués (3° 32' 44" S e 57° 41' 30" W; altitude média 18m), Estado do Amazonas, Brasil. Seu clima é tropical chuvoso, com temperatura média de 28°C e variações entre 26°C (mínima) e 32°C (máxima) (PREFEITURA DE MAUÉS, 2012).

Figura 1 – A) e B) Coletas das amostras de rizosfera de guaranazeiros para o estudo, no município de Maués – AM

Para o isolamento de rizobactérias em *Paullinia Cupana*, foram coletadas cinco amostras de raízes, contendo um pouco de solo a elas aderido, de cinco diferentes plantas adultas (uma amostra por planta), todas pertencentes ao mesmo clone (série 800), cultivadas no mesmo tipo de solo e sob o mesmo clima. As amostras de raízes foram conservadas em sacos plásticos e acondicionadas a 4°C em caixas de isopor com gelo para o transporte até o Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP) em Piracicaba, SP, onde foram imediatamente processadas.

3.2 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de rizobactérias

Para o isolamento das rizobactérias, foram pesados 10 g de cada amostra e adicionados em 90 mL de solução tampão PBS esterilizada (NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g; 1000 mL de água destilada; pH 7,4) em *erlenmeyers* previamente autoclavados, os quais foram agitados durante 30 minutos a 150 rpm. Procedeu-se então, em tampão PBS, as diluições seriadas, de fator 10, das suspensões de solo obtidas.

Foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas utilizadas e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em duplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultura Triptona Soja Ágar (TSA) 10 % (Oxoid®) (suplementado com benomil (50 µg.mL⁻¹) para evitar contaminação fúngica) e incubadas invertidas à temperatura de 28°C por 48 horas. As colônias obtidas foram contadas e, depois, selecionadas aleatoriamente. Para o cálculo da contagem total de rizobactérias isoladas foi realizada uma média da contagem das duas placas semeadas com alíquotas de cada uma das diluições, e o resultado foi multiplicado pelo fator da diluição que a amostra foi submetida. A purificação das colônias foi feita por estrias de esgotamento em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura (TSA 10%), então incubadas invertidas por mais 48 horas.

Depois de confirmada a pureza das culturas, as linhagens bacterianas foram inoculadas em microtubos de 1,5 mL contendo meio Tryptic Soy Broth (TSB) 100% (Oxoid®) suplementado com glicerol 15% e armazenados em freezer a -80°C.

As linhagens obtidas receberam códigos para facilitar a apresentação dos dados. Todos receberam a sigla RZ (referente à rizosfera) seguida de um mesmo número quando pertencentes a mesma planta (de 1 a 5). Após o número referente à planta, segue a sigla MS (referente à planta sadia de Maués-AM) e depois números sequenciais para distinguir as diferentes linhagens.

Todos os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas primeiramente em meio TSA 10% sólido a 28°C.

3.3 Extração de DNA das rizobactérias

Os isolados foram retirados do estoque a -80°C, transferidos para meio de cultura TSA 10% sólido e incubados a 28°C, até o aparecimento de colônias isoladas. Em seguida, os mesmos foram repicados em meio líquido TSB 100% por 48 horas a 28°C, sob agitação

constante (150 rpm). A cultura bacteriana foi então centrifugada por 10 minutos a 10.000 g e o precipitado obtido foi ressuspensionado com 700 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), 30 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida, a suspensão foi agitada no Homogeneizador de Células (Ação Científica) por 30 segundos. O DNA foi purificado pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) e sua integridade foi avaliada por meio de gel de eletroforese em gel de agarose (0,8% p/v) a (3 volts.cm⁻¹) em tampão TEB 1x e corado com brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹).

3.4 Amplificação, purificação e sequenciamento do gene 16S rDNA

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada diretamente das colônias bacterianas crescidas em meio TSA 10% sólido, ou então pela extração de DNA (item 3.3.). Para as reações de PCR foram utilizados os primers R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (HEUER et al., 1997), e a reação foi realizada nas seguintes condições: 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 M de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase, Tampão 10X, num volume final de 50 µL. O gene 16S rDNA foi amplificado com desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 minuto a 62,5°C; 30 segundos a 72°C, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems).

O produto das reações foi analisado em gel de agarose (1% p/v) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Fermentas) e fotodocumentado.

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados (aproximadamente 1400 pb) foram purificados com polietileno glicol (PEG 8000). Esta solução é preparada com 10 g de PEG 8000 e 7,3 g de NaCl solubilizados em 45 mL de água Mili-Q a 37°C, sob agitação. A solubilização leva em torno de 30 minutos e, ao final, o volume deve ser completado para 50 mL.

A reação foi iniciada em um tubo *eppendorf* de 1,5 mL, no qual foi adicionado 50 µL do produto de PCR e 50 µL da solução de PEG, sendo a solução misturada com o auxílio de uma pipeta e incubada por 15 minutos a 37°C. Em seguida, o tubo foi centrifugado em alta velocidade (10.000g) por 15 minutos a temperatura ambiente. Com a ajuda de uma pipeta, todo o sobrenadante foi descartado.

Ao pellet, foi adicionado 125 µL de etanol 80% gelado (de boa qualidade), correndo o líquido pela lateral do tubo, deixando a solução descansar por 1 minuto a temperatura

ambiente. Após esse tempo, foi retirado o sobrenadante com auxílio sempre de pipeta, e foram repetidos os dois últimos passos.

Ao final, o restante do álcool foi deixado secar a 37°C por 15 minutos e o produto foi dissolvido em 30 µL de água Mili-Q.

Os fragmentos de 1400 pb foram enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano - USP/ São Paulo. O sequenciamento foi realizado com o primer 1387R (HEUER et al., 1997).

As linhagens utilizadas nos testes de promoção de crescimento em casa de vegetação tiveram o 16S rDNA sequenciado completamente. Para isso, foram utilizados os iniciadores propostos por Thompson et al. (2001) apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos (*primers*) para amplificação do gene 16S rDNA (Thompson et al., 2001)

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
16F358	5' CTC CTA CGG GAG GCA GT 3'
16F536	5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3'
16F926	5' AAC TCA AAG GAA TTG ACG G 3'
16R339	5' ACT GCT GCC TCC CGT AGG AG 3'
16R519	5' GTA TTA CCG CGG CTG CTG 3'
16R1241	5' GCT ACA CAC GTG CTA CAA TG 3'

3.5 Edição e análise das sequências 16S rDNA

As sequências obtidas foram visualizadas e editadas utilizando-se o software MEGA 5 (TAMURA et al. 2011). O início e o final de algumas sequências foram desprezados e os espaços (gaps) foram deletados de modo que todas as sequências ficaram do mesmo tamanho. Através do programa *DNA Baser Assembler* (disponível em <http://www.dnabaser.com/>) foram obtidas as sequências consenso daquelas que tiveram seu gene 16S rDNA inteiramente sequenciado.

Essas sequências foram, então, comparadas com sequências depositadas nos seguintes bancos públicos:

Ribosomal Database Project II (RDP) (www.rdp.cme.msu.edu) utilizando o programa *Classifier* com 95% de confiança para atribuir as sequências 16S rDNA (WANG et al, 2007).

O RDP utiliza como classificador o *Naive Bayesian rRNA Classifier* (Versão 1.0, Novembro 2003) e a taxonomia hierárquica se baseia no Manual de sistemática bacteriológica *Bergey* (GARRITY et al., 2004; MAIDAK et al., 1999) e

GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando, para tal propósito, a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). Esse programa está disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov. Pôde-se, aqui, determinar a identidade das linhagens com sequências existentes no banco de dados.

3.6 Análises estatísticas baseadas nas UTOs: Rarefação e Índice de Cobertura

A partir das sequências geradas foram obtidas Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) correspondentes (SCHLOSS et al., 2009). A estimativa da riqueza das OTUs foi obtida pelo programa MOTHUR, que foi utilizado para a construção da curva de rarefação – que indica o grau de amostragem da comunidade ao relacionar o número de sequências e o número de OTUs formadas por elas. O programa computacional MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) gera os dados de rarefação considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências.

3.7 Seleção de rizobactérias com potencial para a promoção de crescimento em plantas

Todas as 101 linhagens identificadas foram avaliadas quanto a produção de ácido indol acético (AIA), fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de sideróforos a fim de se selecionar aquelas mais promissoras como promotoras de crescimento em ensaios em casa de vegetação. Essa seleção foi realizada de acordo com as características das bactérias que obtiveram melhores resultados nos testes realizados, os seguintes critérios foram considerados: a bactéria deveria ser positiva para pelo menos 3 dos 4 mecanismos estudados, apresentar índice de solubilização de fosfato (ISF) pelo menos média (se positiva para solubilização de fosfato), índice de produção de sideróforo (IPS) maior que 1,5 (se positiva para produção de sideróforos) ou ter se destacado em algum experimento específico.

3.7.1 Detecção e quantificação da produção de Ácido Indol-Acético (AIA)

Para a quantificação da produção de AIA, utilizou-se como referência o método originalmente proposto por Bric et al. (1991), adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003). As bactérias foram cultivadas em meio TSB 10% contendo L-triptofano (5 mM) e incubadas no escuro a 28°C, sob agitação constante, por 72 horas. Após este período de incubação, centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 g e 900 µL do sobrenadante foram coletados e colocados em cubetas adicionados de 400 µL do Reagente de Salkowski (composto por 2mL de FeCl_3 (0,5 mol L^{-1}) e 98 mL de HClO_4 (35%)). O controle negativo foi feito utilizando apenas o meio de cultura TSB 10% com L-triptofano (5mM) acrescido do Reagente de Salkowski.

A leitura foi realizada a 520nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech), 30 minutos após a adição do reagente de Salkowski. A concentração de AIA detectada no sobrenadante foi determinada utilizando-se curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 100 µg.mL⁻¹. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas (Figura 2). Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 2 – Cubetas de plástico contendo meio com coloração apresentada pelo controle (meio de cultura acrescido do reagente de Salkowski) em triplicata, e coloração rósea apresentada no meio inoculado por linhagem positiva para produção de Ácido Indol Acético, também em triplicata

3.7.2 Fixação biológica de nitrogênio

A capacidade das linhagens em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*. O meio NFb, livre de nitrogênio, foi preparado contendo a seguinte

composição em g.L^{-1} : ácido málico, 5; K_2HPO_4 , 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2; NaCl , 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02; KOH , 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6,5 (DÖBEREINER et al., 1995). Foram utilizados tubos de ensaio de 20 x 70 mm, contendo 7 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, onde as linhagens foram inoculadas com alça de platina, a partir de culturas crescidas em meio NFb semi-sólido. A incubação foi realizada por 96 horas a 28°C no escuro. Após esse período foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos tubos (Figura 3). Foram realizadas três repetições para cada linhagem bacteriana. Esse procedimento foi realizado mais uma vez. A reinoculação sucessiva das linhagens é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica das linhagens (CATTELAN, 1999). Como controle positivo para verificar a validade do meio foi utilizada a bactéria 33.1 (QUECINE et al., 2012).

Figura 3 – Películas formadas em meio de cultura livre de nitrogênio, indicando resultado positivo para teste de fixação de nitrogênio. O teste foi realizado em triplicata para cada linhagem e em duas inoculações sucessivas

3.7.3 Solubilização de fosfato inorgânico

A habilidade das bactérias de solubilizar fosfato foi avaliada de acordo com Verma, Ladha e Tripathi (2001) e Rodríguez e Fraga (1999). As bactérias foram inoculadas, em quadruplicata, em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel (10 g.L^{-1} de glicose; 5 g.L^{-1} de NH_4Cl ; 1 g.L^{-1} de NaCl ; 1 g.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,8 g.L^{-1} de Ca_3HPO_4 ; 15 g.L^{-1} de ágar; pH 7,2). As placas, que possuíam todas o mesmo volume de meio, foram incubadas por

120 horas e então visualizadas quanto à presença de halo ao redor das linhagens capazes de solubilizar fosfato. Como controle positivo para verificar a validade do meio foi utilizada a bactéria 33.1 (QUECINE et al., 2012).

Para fins semi-quantitativos, foram medidos os diâmetros dos halos claros formados ao redor de cada colônia (Dh), com auxílio de uma régua milimetrada, e os diâmetros das colônias correspondentes (Dc) (Figura 4). Com os dados, pôde-se calcular a razão: $(Dh)/(Dc)$. De modo que linhagens que solubilizam mais fosfato, obtêm maiores razões e, portanto, apresentam maiores Índices de Solubilização de Fosfato (ISF) (BERRAQUERO et al., 1976).

De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), a solubilização pode ser classificada como baixa ($ISF < 2$), média ($2 < ISF < 3$) e alta ($ISF > 3$).

Figura 4 – Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização (D_h) e do diâmetro da colônia (D_c), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por linhagem positiva, inoculada em quadruplicata

3.7.4 Detecção da produção de sideróforos

A análise de cromoazurol S (CAS) Agar foi realizada conforme a seguir (SCHWYN; NEILANDS, 1987): 60,5 mg de CAS foram dissolvidos em 50 mL de água miliQ e misturada com 10 mL de Ferro (III) ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1mM em HCl 10mM). Sob agitação, esta solução foi vagarosamente adicionada a 72,9 mg de HDTMA (Hexadecyltrimethylammonium) dissolvido em 40 mL de água. Estas soluções foram autoclavadas separadamente. Separadamente também foi autoclavado um meio de cultura deficiente em ferro (MM9) de acordo com Payne (1994), modificado por SILVA-STENICO et al. (2005). O meio era composto de (1L):

KH_2PO_4 $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, NaCl $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, NH_4Cl $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. Em 100 mL desta solução foram adicionados 1,2 g de Tris e 18 g de ágar, pH 5,6, completado para 1 L e autoclavada. Esta solução foi suplementada com 30 mL de casaminoácido desferrado 10% (m/v), manitol 2 g.L^{-1} , 1mL de MgCl_2 1M e 1 mL de CaCl_2 100mM. A solução de CAS foi adicionada ao meio MM9 e as placas foram inoculadas com linhagens de culturas estoques e incubadas a 28°C por 24 horas. A mudança de cor de azul para amarelo do meio CAS foi notada.

Para fins semi-quantitativos, foram medidos os diâmetros dos halos amarelos formados ao redor de cada colônia (D_h), com auxílio de uma régua milimetrada, e os diâmetros das colônias correspondentes (D_c) (Figura 5). Com os dados, pôde-se calcular a razão: $(D_h)/(D_c)$. De modo que linhagens que produzem mais sideróforos, obtêm maiores razões e, portanto, apresentam maiores Índices de Produção de Sideróforo (IPS).

Figura 5 – Representação do diâmetro dos halos indicadores de produção de sideróforo (D_h) e do diâmetro da colônia (D_c), em meio CAS ágar, formados por linhagem positiva, inoculada em quadruplicata

3.8 Eficiência das rizobactérias em promover o crescimento em milho

Para avaliar a eficiência das bactérias em promover o crescimento de milho, foi realizado um experimento em casa de vegetação com duração de 60 dias. A casa de vegetação fica instalada na Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ (ESALQ/USP), no departamento de genética, município de Piracicaba - SP. O material vegetal (sementes da variedade Alto Agrícola 2010-2011) foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Cláudio Lopes Souza Jr., do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Para se realizar o preparo das suspensões rizobacterianas, cada linhagem foi multiplicado separadamente em tubos de ensaio contendo 5 mL de TSB 100% sob agitação a 28°C por 24 horas. Em seguida foi transferido aproximadamente 1 mL do pré-inóculo para *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio líquido TSB 100% (neste momento as linhagens do consórcio foram unidas em apenas um *erlenmeyer*), sendo agitados constantemente por aproximadamente 4 horas a 28°C até que atingisse a fase log, o que correspondia a 10^5 UFC.mL⁻¹ (Figura 6).

Figura 6 - Suspensões rizobacterianas, em fase log de crescimento, correspondentes aos tratamentos (T1, T2, T3 e C) utilizados em casa de vegetação

Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada, passadas por uma solução de sacarose 10%, sendo agitadas e escorridas. Depois de secas, foram imersas e mantidas nas suspensões bacterianas, em falcons de 50 mL (Figura 7), até o momento em que foram semeadas (aproximadamente 30 minutos).

Os tratamentos constaram de um controle (C) contendo somente o meio de cultura TSB, da aplicação nas sementes da linhagem RZ2MS9 – *Bacillus* sp. (T1), RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* (T2) e uma mistura (consórcio) de 5 linhagens (RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans*) (T3).

Figura 7 – Sementes de milho (Variedade Alto Agrícola 2010-2011) mantidas nas suspensões bacterianas correspondentes aos tratamentos T1, T2, T3 e C até o momento da semeadura em casa de vegetação para teste de promoção de crescimento vegetal

As plantas foram cultivadas em vasos com 1,6 kg de substrato comercial farelado grosso composto por turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de *Pinus* da marca Bioplant® e mantidos em casa de vegetação. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com 3 blocos e 10 repetições de cada tratamento em cada bloco (total de 30 repetições por tratamento). Foram colocadas 4 sementes por vaso. As plantas foram irrigadas diariamente por 3 vezes em sistema automático e nenhuma solução nutritiva foi adicionada às mesmas. 30 e 60 dias após a emergência (tempo necessário para que se observassem diferenças de crescimento, mas sem que houvesse o comprometimento da raiz pelo espaço disponível), as plantas foram colhidas. O desbaste foi efetuado. Após a primeira colheita restou somente mais uma planta por vaso para a colheita de 60 dias.

3.8.1 Colheita e variáveis determinadas

Imediatamente após a colheita, separou-se o sistema radicular da parte aérea da planta, sendo ambos lavados em água corrente. No mesmo dia, foi aferida a altura da parte aérea (APA) com o auxílio de uma trena milimetrada. O sistema radicular e a parte aérea de cada planta foram colocados em sacos de papel para posterior secagem em estufa, com ventilação forçada, a 60°C, até o peso constante. Em seguida determinou-se o peso seco da parte aérea (PSPA) e o peso seco do sistema radicular (PSSR), com o auxílio de uma balança analítica. Quatro plantas por tratamento de um dos blocos foram separadas para determinação de seus respectivos teores de nutrientes.

Para análise de nutrientes, as amostras foram enviadas ao Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, da ESALQ/USP, onde foram determinados os valores de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, manganês e zinco

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância para comparação de médias através do programa SAS versão 9.1.

3.9 Observações em microscopia eletrônica de varredura

A título ilustrativo, foram realizadas fotos de microscopia eletrônica de varredura dos isolados mais eficientes como promotores de crescimento em milho. Para isso o material foi desidratado e seco. A desidratação foi feita em série alcoólica crescente em estufa. As amostras foram montadas em lâmina histológica e metalizados com camada de ouro de aproximadamente 20 nm de espessura em corrente de 25 mA. As análises e obtenção das imagens (eletromicrografias) foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Leo modelo 1450 VP, equipado com detector de elétrons secundários e retroespalhados (para alto e baixo vácuo) e de sistema de espectroscopia de raios X por dispersão de energia para microanálises.

3.10 Teste de antibiose entre as bactérias do consórcio

As linhagens bacterianas utilizadas no consórcio (T3) (RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans*) foram avaliadas quanto à capacidade de inibir o crescimento uma das outras. Para isso, elas foram previamente crescidas, individualmente, por 24 horas a 28°C em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio TSB líquido. Para os testes de antibiose foram utilizadas placas de meio TSB misturadas com uma suspensão de cada linhagem. Para distribuição nas placas, foram preparados 100 ml do meio TSB adicionados da cultura de cada estirpe crescida previamente nos tubos com meio TSB líquido a 28°C de modo que atingissem a concentração de 10^5 UFC.mL⁻¹. As linhagens foram pingadas (10 µL) nas placas de TSB, de maneira que em cada placa foram inoculadas 4 linhagens diferentes em um meio acrescido da suspensão da 5ª linhagem. Todas as possibilidades de interação foram avaliadas e o teste foi realizado em triplicata. As placas

foram então incubadas por 24h a 28°C, e observadas para a presença ou ausência do halo de inibição de crescimento formado ao redor das estirpes se possuíram atividade antagonista.

3.11 Transformação bacteriana

3.11.1 Microrganismo e plasmídio utilizados

Foi utilizada a linhagem RZ2MS16 geneticamente modificada expressando o gene da *Green Fluorescent Protein* (GFP). Na transformação, foi utilizado o plasmídeo pCM88 gentilmente cedido por Mary E. Lidstrom (Departments of Microbiology – University of Washington, Seattle - USA). Este plasmídeo expressa o gene da GFP sob controle do promotor LacZ, possui resistência a tetraciclina, promotor para bactérias metanogênica mfx e origem de replicação do grupo incP (MARX; LIDSTROM, 2001). Para o inóculo dessa linhagem durante a execução dos experimentos, a mesma foi cultivada em 5 mL de meio LB suplementado com tetraciclina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por até 96 horas sob agitação (150 rpm) a 28°C.

3.11.2 Transformação da linhagem RZ2MS16 com o plasmídio pCM88

Culturas eletrocompetentes da linhagem RZ2MS16 foram obtidas a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em 5 mL de meio LB líquido incubada a 28°C por 18 horas a 250 rpm. Após o crescimento, 1 mL da cultura foi transferido para 50 mL de LB e incubados a 28°C a 180 rpm até atingir a densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,7 medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech). Em seguida a cultura foi centrifugada a 3.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em água deionizada esterilizada e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuspenso em glicerol 10% e centrifugado. O sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi ressuspenso em glicerol 10% ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,15$) para diluição de 500X e distribuído em alíquotas de 100 μL que foram estocadas a -80°C.

O plasmídio quantificado (100ng) foi adicionado a 100 μL da cultura eletrocompetente e introduzidos por eletroporação (Gene Pulser, BioRad - 2,5 kV, 25 μF , 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). As células eletroporadas foram semeadas e incubadas por 18 horas a 28°C em meio sólido LB adicionado de tetraciclina. Vários clones resistentes à tetraciclina e que

expressavam o gene da GFP foram estocados a -80°C . Um dos clones foi selecionado para realização dos ensaios posteriores sendo então denominado linhagem RZ2MS16:*gfp*.

3.11.3 Teste de estabilidade da expressão da GFP

Uma colônia da linhagem RZ2MS16:*gfp* foi inoculada em 5 mL de LB adicionados de $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tetraciclina e incubados sob agitação (180 rpm) a 28°C por 18 horas. Após este período, 50 μL da cultura bacteriana foram adicionados em 50 mL de LB sem tetraciclina e após 24 horas de crescimento nas condições citadas acima, alíquotas da cultura foram diluídas e semeadas em placas de LB sólido sem antibiótico e incubadas a 28°C por 24 horas. Após esse período, foram selecionadas aleatoriamente 100 colônias, as quais foram inoculadas em LB sólido mais antibiótico, incubadas por 24 horas a 28°C , e, feita a avaliação do número de bactérias portadoras que expressam o gene da GFP. A expressão da GFP foi observada por meio de fluorescência em luz ultravioleta.

3.12 Colonização de milho pela linhagem RZ2MS16:*gfp*

Plântulas axênicas de milho foram obtidas a partir das sementes previamente desinfetadas superficialmente (com álcool 70% e hipoclorito), germinadas em placas de petri com papel filtro umedecido, sendo em seguida transferidas para frascos contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). A colonização de RZ2MS16:*gfp* em plantas de milho foi avaliada por microscopia eletrônica de fluorescência, para isso, as plantas germinadas, com aproximadamente 10 cm de altura, foram colocadas em tubos falcon de 50 mL contendo 7 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Esse meio foi inoculado com uma suspensão bacteriana, crescida em meio de cultura LB, para uma concentração final de 10^8 UFC mL^{-1} sobre o sistema radicular. Os tubos mantidos a 28°C em estufa com fotoperíodo de 16 horas luz. No tratamento controle não foi inoculado o microrganismo, somente o meio LB. Portanto, esse experimento foi montado com 2 tratamentos (controle e RZ2MS16:*gfp*) e duas leituras: 4 e 12 dias após inoculação. O experimento foi inteiramente casualizado, nas datas de leitura, foram coletados materiais para a visualização em MOF (2 plantas de cada tratamento para análise).

3.12.1 Microscopia óptica de fluorescência (MOF)

Os materiais analisados por MOF foram simplesmente dispostos em lâmina com água e visualizados imediatamente. Quando a análise requereu cortes, os mesmos foram feitos manualmente a fresco. A captura da imagem foi realizada pela câmera CCD acoplada ao Microscópio de Fluorescência Axiophot, utilizando-se filtro de 365nm para excitação em luz ultravioleta.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de rizobactérias do guaranazeiro

A partir do isolamento de rizobactérias, foi possível estimar a abundância bacteriana por meio da contagem de células viáveis expressas em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC.g⁻¹ de solo). O valor médio de isolados encontrado foi $4,6 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ solo.

4.2 Composição da comunidade bacteriana e classificação taxonômica

Foram identificados, por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, um total de 101 bactérias isoladas da rizosfera do guaranazeiro. O critério de seleção para o sequenciamento foi baseado na morfologia das bactérias, tentando abranger os diferentes aspectos e formas apresentados pelas linhagens. As sequências obtidas do gene 16S rDNA foram comparadas com sequências do banco de dados RDP (Ribosomal Database Project – www.rdp.cme.edu). Essa análise resultou na distribuição das sequências onde foi possível identificar 14 gêneros diferentes entre as linhagens, sendo que a grande maioria pertence ao filo Proteobacteria, seguido de Firmicutes, Bacteroidetes e em menor porcentagem Actinobacteria. Foi possível observar que, dentro do filo mais abundante, a classe predominantemente isolada foi *Betaproteobacteria* e, dentro desta, a ordem *Burkholderiales*, família *Burkholderiaceae*, gênero *Burkholderia* (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Distribuição das rizobactérias isoladas dos guaranazeiros ao nível taxonômico de filo no gráfico principal, e distribuição ao nível taxonômico de classe dentro do filo mais abundante, no gráfico secundário. Dados obtidos a partir do RDP (Ribosomal Database Project)

Figura 9 – Distribuição das rizobactérias isoladas dos guaranazeiros ao nível taxonômico de classe no gráfico principal, e distribuição ao nível taxonômico de gênero dentro da classe mais abundante, no gráfico secundário. Dados obtidos a partir do RDP (Ribosomal Database Project)

As sequências também foram comparadas com as sequências do GenBank através do programa BLASTn (NCBI – www.ncbi.nih.gov). No Anexo A são mostradas as linhagens e suas respectivas identificações de similaridade do 16S rDNA que variaram de 89 a 99% utilizando fragmentos de 792 a 1012 pb.

As linhagens selecionadas para serem testadas em milho em casa de vegetação tiveram seu gene 16S rDNA completamente sequenciado. O resultado encontra-se disposto na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências completas do gene 16S rDNA de rizobactérias isoladas do guaranazeiro com as sequências contidas no banco de dados *GenBank* através da ferramenta *Blastn*

Cód.Linhagem	% Identidade	Nº Pb	Nº Acesso melhor similaridade	E-value	Linhagem melhor similaridade no <i>Blastn</i>
RZ1MS6	99%	1359	FJ436055.1	0.0	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
RZ1MS11	99%	1361	NR_042634.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ2MS9	99%	1391	JX566534.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ2MS16	99%	1359	CP000440.1	0.0	<i>Burkholderia ambifaria</i>
RZ4MS18	99%	1372	CP000884.1	0.0	<i>Delftia acidovorans</i>

4.3 Rarefação e Índice de Cobertura

A análise de rarefação demonstra que os filotipos bacterianos encontrados na rizosfera do guaranazeiro foram acessados, sendo que a 3% de dissimilaridade foi alcançado uma tendência de início de *plateau* por volta de 20 filotipos (Figura 10). Os índices de cobertura também apresentaram uma alta porcentagem (88,66%), demonstrando que se obteve uma cobertura satisfatória das amostras.

Figura 10 – Análise de rarefação de filotipos componentes da comunidade bacteriana isolada da rizosfera do guaranazeiro. As análises são baseadas em sequências parciais do gene 16S ribossômico. As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos. Gráfico contruído a partir de dados obtidos do programa *Mothur*

4.4 Seleção de rizobactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal

4.4.1 Produção de AIA

Das 101 linhagens avaliadas para a produção de AIA, apenas 11 não produziram ácido-indol-acético: RZ1MS1 (*Ralstonia pickettii*), RZ1MS10 (*Dyella terrae*), RZ2MS5 (*Bacillus anthracis*), RZ3MS1 (*lysobacter* sp.), RZ3MS12 (*Cupriavidus gilardii*), RZ3MS15 (*Bacillus* sp.), RZ3MS21 (*Bacillus* sp.), RZ3MS27 (*Bacillus thuringiensis*), RZ4MS10 (*Dyella marenensis*), RZ5MS6 (*Chryseobacterium* sp.) e RZ5MS7 (*Streptomyces* sp.).

Os valores de produção de AIA entre todas as linhagens variaram de 2,77 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 495,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Anexo B). Duas linhagens, uma do gênero *Ralstonia* (RZ2MS6) e outra do gênero *Bacillus* (RZ2MS10), apresentaram a menor concentração observada e a linhagem do gênero *Delftia* (RZ4MS18) apresentou a maior concentração observada.

Entre os gêneros mais abundantes (*Burkholderia* e *Bacillus*) apenas o gênero *Burkholderia* teve todos os representantes produtores de AIA. As médias apresentadas por esses gêneros encontram-se expostos na Tabela 3. Pode-se observar que a média de produção do gênero *Burkholderia* foi superior a média de produção do gênero *Bacillus*. Dentro do

gênero *Burkholderia*, os valores de produção de AIA variaram de 4,82 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 233,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 11).

Tabela 3 – Médias de produção de AIA (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) entre os gêneros mais abundantes (*Burkholderia* e *Bacillus*) observados nesse estudo

Gênero bacteriano	% de linhagens produtores de AIA	Média de produção de AIA ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
<i>Burkholderia</i> sp.	100%	49,87 ^a
<i>Bacillus</i> sp.	87%	16,10 ^b

^a Média de 31 linhagens

^b Média de 31 linhagens

Figura 11 – Valores de produção de AIA (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentados pelas linhagens identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. do presente estudo

4.4.2 Potencial de fixação de nitrogênio

Vinte e quatro linhagens (23% do total) foram capazes de crescer e formar película em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio por duas inoculações sucessivas sugerindo a fixação biológica de nitrogênio por essas linhagens. Os resultados encontram-se expostos no Anexo B.

O gênero *Burkholderia* foi o que apresentou mais representantes entre os fixadores de nitrogênio (16 linhagens, 66,7% das fixadoras), enquanto o gênero *Bacillus* representou 16,7% (com 4 linhagens entre as fixadoras), o gênero *Ralstonia*, 4,2% (com 1 linhagem entre as fixadoras) e outros, 12,5% (3 linhagens: 2 pertencentes ao gênero *Delftia* e 1 ao gênero *Dyella*) (Figura 12).

Figura 12 – Distribuição dos gêneros de linhagens rizobacterianas entre aquelas positivas para o teste de fixação de nitrogênio

Observando dentro dos gêneros isolados mais abundantes (*Burkholderia* e *Bacillus*), pode-se observar fixação de nitrogênio por 52% dos isolados do gênero *Burkholderia* e 13% dos isolados do gênero *Bacillus*, como mostra a Figura 13.

Figura 13 – Distribuição de linhagens positivas e negativas para fixação biológica de nitrogênio dentro de cada gênero entre as mais abundantes do presente estudo

4.4.3 Solubilização de fosfato inorgânico

As linhagens bacterianas foram avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Dessas, 43 linhagens apresentaram halo em torno das colônias, representando 43% do total, indicando o potencial de solubilização de fosfato pelas mesmas. Os resultados encontram-se expostos no Anexo B.

De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), podemos organizar as linhagens positivas para solubilização de fosfato em três classes: Linhagens com baixo potencial de solubilização ($\text{ISF} < 2$), com médio potencial de solubilização ($2 < \text{ISF} < 3$) e com alto potencial de solubilização ($\text{ISF} > 3$).

Considerando os gêneros mais abundantes de linhagens neste estudo (*Burkholderia* e *Bacillus*), podemos observar sua distribuição entre as classes de solubilizadores na Figura 14. Na classe onde o $\text{ISF} < 2$, observa-se, entre as linhagens desta classe, 23,1% de representantes do gênero *Burkholderia* e nenhum do gênero *Bacillus*; na classe onde $2 < \text{ISF} < 3$, observamos a predominância do gênero *Burkholderia*, com 73,9% de representantes nesta classe de solubilização, observa-se também, entre as linhagens desta classe, 17,4% de representantes do gênero *Bacillus*; por último, na classe onde $\text{ISF} > 3$ observamos apenas representantes do gênero *Burkholderia*.

Figura 14 – Distribuição dos gêneros mais abundantes dentro das 3 classes de solubilização de fosfato, segundo Silva Filho e Vidor (2000) ($\text{ISF} < 2$: baixa; $2 < \text{ISF} < 3$: média; $\text{ISF} > 3$: alta)

Na classe onde $ISF > 3$ (alta solubilização), os ISF variaram de 3,1 a 3,8. As linhagens e respectivos ISF são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Índices de Solubilização de Fosfato (ISF) observados na classe que apresentou altos ISF segundo Silva Filho e Vidor (2000), e respectivas identificações das linhagens por similaridade obtida no *Blastn*

Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no Blastn	ISF
RZ2MS4	<i>Burkholderia anthina</i>	3,3
RZ3MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	3,8
RZ3MS9	<i>Burkholderia</i> sp.	3,3
RZ3MS19	<i>Burkholderia</i> sp.	3,8
RZ4MS11	<i>Burkholderia</i> sp.	3,1
RZ4MS14	<i>Burkholderia stabilis</i>	3,2
RZ5MS5	<i>Burkholderia</i> sp.	3,5

4.4.4 Produção de sideróforos

Finalmente, as linhagens bacterianas foram avaliadas quanto à produção de sideróforos. Destas, 24 linhagens apresentaram halos amarelados em torno das colônias, representando 24% do total. Os resultados encontram-se expostos no Anexo B.

Entre as linhagens positivas para o teste de produção de sideróforos, 87% pertencem ao gênero *Burkholderia* (20 linhagens), das 4 linhagens positivas restantes, 2 pertencem ao gênero *Delftia*, 1 ao gênero *Dyella*, e 1 ao gênero *Bacillus*. Foi possível observar também que os Índices de Produção de Sideróforo (IPS) variaram de 1,4 a 3,4 (Tabela 5) e ainda que as linhagens positivas dos gêneros *Delftia* e *Dyella* apresentaram IPS baixos.

Tabela 5 – Índices de Produção de Sideróforo (IPS) observados e respectivas identificações das linhagens por similaridade obtida no *Blastn*

(Continua)		
Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no Blastn	IPS
RZ1MS3	<i>Burkholderia</i> sp.	3,0
RZ1MS4	<i>Burkholderia</i> sp.	1,6
RZ1MS6	<i>Burkholderia</i> sp.	2,9
RZ1MS11	<i>Burkholderia</i> sp.	1,5
RZ1MS15	<i>Burkholderia</i> sp.	3,0
RZ1MS19	<i>Burkholderia</i> sp.	3,1
RZ1MS21	<i>Burkholderia</i> sp.	1,7

Tabela 5 – Índices de Produção de Sideróforo (IPS) observados e respectivas identificações das linhagens por similaridade obtida no Blastn

(Conclusão)		
Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no Blastn	IPS
RZ2MS2	<i>Burkholderia</i> sp.	1,7
RZ2MS4	<i>Burkholderia anthina</i>	1,5
RZ2MS7	<i>Burkholderia</i> sp.	2,4
RZ2MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	1,7
RZ2MS9	<i>Bacillus</i> sp.	3,4
RZ2MS16	<i>Burkholderia</i> sp.	2,7
RZ2MS20	<i>Burkholderia</i> sp.	2,6
RZ3MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	1,6
RZ3MS9	<i>Burkholderia</i> sp.	1,4
RZ3MS19	<i>Burkholderia</i> sp.	1,5
RZ3MS24	<i>Burkholderia</i> sp.	3,1
RZ4MS6	<i>Delftia acidovorans</i>	1,5
RZ4MS12	<i>Delftia acidovorans</i>	1,6
RZ4MS13	<i>Dyella marenensis</i>	1,4
RZ4MS14	<i>Burkholderia stabilis</i>	2,0
RZ4MS15	<i>Burkholderia</i> sp.	1,5
RZ5MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	1,5

Entre as linhagens positivas, podem-se destacar RZ1MS3, RZ1MS6, RZ1MS15, RZ1MS19, RZ2MS16, RZ2MS20 e RZ3MS2 (todas do gênero *Burkholderia*) e a linhagem RZ2MS9 (do gênero *Bacillus*), por apresentarem maiores Índices de Produção de Sideróforos (IPS) (acima de 2,5).

4.5 Seleção final para o ensaio de promoção de crescimento em milho

Os resultados da produção de AIA, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e de produção de sideróforos permitiram a seleção de 27 linhagens que mostraram potencial para promoção de crescimento, destes, somente 5 foram selecionados para serem introduzidos em sementes e avaliado o potencial de promoção de crescimento em plantas de milho. A Tabela 6 mostra as características das bactérias que obtiveram melhores resultados nos testes realizados, elas foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: serem positivas para pelo menos 3 dos 4 mecanismos estudados, apresentarem ISF pelo menos média (se positivas para solubilização de fosfato), IPS maior que 1,5 (se positivas para produção de sideróforos) ou por terem se destacado em algum experimento específico. A Tabela 7 mostra as

características apresentadas pelas bactérias que foram utilizadas em experimentos de promoção de crescimento. Os tratamentos utilizados no presente estudo constaram de um controle (C) contendo somente o meio de cultura TSB, da aplicação nas sementes da linhagem RZ2MS9 – *Bacillus* sp. (T1), RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* (T2) e uma mistura (consórcio) de 5 linhagens (RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans* (T3).

Tabela 6 – Características apresentadas pelas linhagens que obtiveram melhores resultados nos testes realizados *in vitro*

Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no <i>Blastn</i>	AIA ^a (µg.mL ⁻¹)	FBN ^b	ISF ^c	IPS ^d
RZ1MS3	<i>Burkholderia</i> sp.	42,5	-	2,5	3,0
RZ1MS4	<i>Burkholderia</i> sp.	67,0	-	2,5	1,6
RZ1MS6	<i>Burkholderia</i> sp.	56,4	+	2,2	2,9
RZ1MS9	<i>Bacillus</i> sp.	129,9	+	2	0,0
RZ1MS11	<i>Burkholderia</i> sp.	132,6	+	2,5	1,5
RZ1MS15	<i>Burkholderia</i> sp.	41,8	-	2,3	3,0
RZ1MS21	<i>Burkholderia</i> sp.	42,9	-	2,0	1,7
RZ2MS2	<i>Burkholderia</i> sp.	19,7	-	2,4	1,7
RZ2MS4	<i>Burkholderia anthina</i>	28,4	+	3,3	1,5
RZ2MS7	<i>Burkholderia</i> sp.	38,9	+	2,0	2,4
RZ2MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	32,9	+	2,6	1,7
RZ2MS9	<i>Bacillus</i> sp.	67,4	+	2,6	3,4
RZ2MS16	<i>Burkholderia</i> sp.	175,0	+	0,0	2,7
RZ2MS20	<i>Burkholderia</i> sp.	49,9	+	2,1	2,6
RZ3MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	26,5	+	3,8	1,6
RZ3MS19	<i>Burkholderia</i> sp.	49,1	-	3,8	1,5
RZ3MS22	<i>Burkholderia</i> sp.	47,6	+	2,7	0,0
RZ3MS24	<i>Burkholderia</i> sp.	233,1	+	2,5	3,1
RZ3MS25	<i>Bacillus</i> sp.	15,4	+	2,8	0,0
RZ3MS26	<i>Burkholderia</i> sp.	20,0	+	2,5	0,0
RZ4MS6	<i>Delftia acidovorans</i>	40,7	+	2,6	1,5
RZ4MS8	<i>Burkholderia nodosa</i>	40,2	+	2,1	0,0
RZ4MS11	<i>Burkholderia</i> sp.	42,2	+	3,1	0,0
RZ4MS12	<i>Delftia acidovorans</i>	55,6	+	0,0	1,6
RZ4MS14	<i>Burkholderia stabilis</i>	14,6	+	3,2	2,0
RZ4MS18	<i>Delftia acidovorans</i>	495,2	-	0,0	0,0
RZ5MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	51	-	2,8	1,5

^a - Concentração de ácido indol acético produzido pelas linhagens;

^b - Fixação Biológica de Nitrogênio;

^c - Índice de Solubilização de Fosfato;

^d - Índice de Produção de Sideróforos.

Tabela 7 – Características apresentadas pelas linhagens selecionadas para serem inoculados em milho e testadas em casa de vegetação

Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no <i>Blastn</i>^a	AIA^b ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FBN^c	ISF^d	IPS^e
RZ1MS6	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	56,4	+	2,2	2,9
RZ1MS11	<i>Burkholderia</i> sp.	132,6	+	2,5	1,5
RZ2MS9	<i>Bacillus</i> sp.	67,4	+	2,6	3,4
RZ2MS16	<i>Burkholderia ambifaria</i>	175,0	+	0,0	2,7
RZ4MS18	<i>Delftia acidovorans</i>	495,2	-	0,0	0,0

^a – Considerando sequenciamento total do gene 16S rDNA

^b – Concentração de ácido indol acético produzido pelas linhagens;

^c – Fixação Biológica de Nitrogênio;

^d – Índice de Solubilização de Fosfato;

^e – Índice de Produção de Sideróforos.

4.6 Eficiência das rizobactérias selecionadas de promover o crescimento em milho

Após 30 e 60 dias de condução do experimento em casa de vegetação, as plantas de milho foram coletadas para avaliação do efeito no seu crescimento quando inoculadas com as suspensões bacterianas das linhagens selecionadas no presente trabalho. Foram avaliadas as variáveis: altura da parte aérea (APA), peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco do sistema radicular (PSSR).

Nas avaliações realizadas aos 30 dias após a germinação, observou-se que para a variável altura da parte aérea (APA), os tratamentos T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) e T2 (RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) não diferiram significativamente entre si, entretanto, apresentaram um aumento significativo de 35,5% e 35,2%, respectivamente, em relação ao controle. Pôde-se observar, ainda, que o tratamento T3 (consórcio) não diferiu significativamente do controle a 5% de significância (Figura 15).

Nas avaliações realizadas aos 60 dias após a germinação, observou-se ainda que para a variável altura da parte aérea (APA), os tratamentos T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) e T2 (RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) não diferiram significativamente entre si, entretanto, apresentaram um aumento significativo de 39,4% e 33,3%, respectivamente, em relação ao controle. Pôde-se observar, ainda, que no tratamento T3 (consórcio), houve um decréscimo significativo de 14,85% quando comparado ao controle (Figura 15).

Comparando-se todos os tratamentos nos dois tempos analisados, observamos que o maior valor médio obtido para a variável altura da parte aérea (APA) foi de 98,9 cm,

apresentado pelo tratamento T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) aos 60 dias após a germinação (Figura 15).

Figura 15 – Médias das alturas das partes aéreas (APA) em centímetros (cm), de 30 plantas, aferidas aos 30 e 60 dias após a germinação para cada tratamento adotado no presente trabalho. Médias seguidas da mesma letra minúscula, assim como da mesma letra maiúscula, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Nas avaliações realizadas aos 30 dias após a germinação, observou-se que para a variável peso seco da parte aérea (PSPA), os tratamentos T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) e T2 (RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) não diferiram significativamente entre si, entretanto, apresentaram um aumento significativo de 142,6% e 127,6% respectivamente, em relação ao controle. Pôde-se observar, ainda, que o tratamento T3 (consórcio) não diferiu significativamente do controle a 5% de significância (Figura 16).

Nas avaliações realizadas aos 60 dias após a germinação, observou-se ainda que para a variável peso seco da parte aérea (PSPA), o tratamento T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) também apresentou maior peso seco médio correspondendo a um aumento significativo de 235,9% em relação ao controle, enquanto o tratamento T2 (RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) correspondeu a um aumento significativo de 114,5% em relação ao controle. Pôde-se observar, ainda, que o tratamento T3 (consórcio) não diferiu significativamente do controle a 5% de significância (Figura 16).

Figura 16 – Médias dos pesos secos das partes aéreas (PSPA) em gramas (g), de 30 plantas, aferidas aos 30 e 60 dias após a germinação para cada tratamento adotado no presente trabalho. Médias seguidas da mesma letra minúscula, assim como da mesma letra maiúscula, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Nas avaliações realizadas aos 30 dias após a germinação, observou-se que para a variável peso seco do sistema radicular (PSSR), os tratamentos T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) e T2 (RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) não diferiram significativamente entre si, entretanto, apresentaram um aumento significativo de 75,4% e 54,4% respectivamente, em relação ao controle. Pôde-se observar, ainda, que o tratamento T3 (consórcio) não diferiu significativamente do controle a 5% de significância (Figura 17).

Nas avaliações realizadas aos 60 dias após a germinação, observou-se ainda que para a variável peso seco do sistema radicular (PSSR), o tratamento T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) também apresentou maior peso seco médio correspondendo a um aumento significativo de 247,8% em relação ao controle, enquanto o tratamento T2 (RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) correspondeu a um aumento significativo de 136,5% em relação ao controle. Pôde-se observar, ainda, que o tratamento T3 (consórcio) não diferiu significativamente do controle a 5% de significância (Figura 17).

Figura 17 – Médias dos pesos secos dos Sistemas radiculares (PSSR) em gramas (g), de 30 plantas, aferidas aos 30 e 60 dias após a germinação para cada tratamento adotado no presente trabalho. Médias seguidas da mesma letra minúscula, assim como da mesma letra maiúscula, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Logo, a capacidade de promoção de crescimento em condições de casa de vegetação por meio da veiculação das bactérias pelas sementes foi verificada para as rizobactérias RZ2MS9 – *Bacillus* sp. (T1) e RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* (T2) que se destacaram para todas as variáveis testadas, promovendo crescimento em plantas de milho (Figura 18). Já em T3 (consórcio), o efeito dessas linhagens não foi significativo. A interação entre as linhagens que compõem o T3 (consórcio) foi também analisada neste trabalho. Todos os resultados obtidos foram agrupados na Tabela 8, para melhor visualização dos dados.

Figura 18 – Promoção de crescimento em plantas de milho colhidas aos 30 dias após germinação. A) A esquerda, planta inoculada com o T1 (RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) e a direita, planta controle (não inoculada); B) A esquerda, planta inoculada com T2 (RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) e a direita, planta controle (não inoculada)

Tabela 8 – Variáveis analisadas em milho após inoculação dos tratamentos. Dados seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Tratamentos	Variáveis					
	APA 30 ¹ (cm)	APA 60 ² (cm)	PSPA 30 ³ (g)	PSSR 30 ⁴ (g)	PSPA 60 ⁵ (g)	PSSR 60 ⁶ (g)
T1	83,87 a	98,93 a	3,70 a	0,50 a	13,22 a	3,20 a
T2	83,67 a	94,60 a	3,47 a	0,44 a	08,44 b	2,18 b
T3	59,27 b	61,47 c	1,38 b	0,24 b	02,13 c	0,71 c
C	61,90 b	70,97 b	1,53 b	0,28 b	03,94 c	0,92 c

¹ Altura da parte aérea 30 dias após germinação;

² Altura da parte aérea 60 dias após inoculação;

³ Peso seco da parte aérea 30 dias após germinação;

⁴ Peso seco do sistema radicular 30 dias após germinação;

⁵ Peso seco da parte aérea 60 dias após germinação;

⁶ Peso seco do sistema radicular 60 dias após germinação.

4.7 Observação em microscopia eletrônica de varredura

As fotos obtidas por microscopia eletrônica de varredura expõem a morfologia apresentada pelas linhagens isoladas do guaranazeiro mais eficientes como promotoras de crescimento de milho: RZ2MS9 (*Bacillus* sp.) e RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) (Figura 19).

Figura 19 – Morfologia apresentada, em microscopia eletrônica de varredura, por: A) Linhagem RZ2MS9 (*Bacillus* sp.) e B) RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*)

4.8 Análise de nutrientes

Na Tabela 9 são apresentados os resultados médios dos conteúdos de diferentes nutrientes presentes na parte aérea das plantas de milho cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Através da comparação entre elas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, observa-se que a acumulação dos macronutrientes N e Mg, assim como a acumulação do micronutriente Mn, na parte aérea das plantas de milho não foram influenciadas pelos tratamentos adotados. Entretanto, o acúmulo de P na parte aérea foi inferior quando as plantas foram cultivadas com inoculação do T2, o acúmulo de K foi superior quando as plantas foram cultivadas sem inoculação (controle), o acúmulo de Ca foi superior em plantas cultivadas com inoculação do T1, o acúmulo de S foi inferior em plantas cultivadas com inoculação de T2 e T3, o acúmulo de Cu foi inferior em plantas cultivadas com inoculação de T3, o acúmulo de Fe foi inferior em plantas cultivadas com inoculação do T2 e, por fim, o acúmulo de Zn foi superior quando as plantas foram cultivadas sem inoculação (controle).

Tabela 9 – Valores médios dos conteúdos dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), em g.Kg⁻¹, e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn), em mg.Kg⁻¹, presentes na parte aérea das plantas de milho cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tratamentos	Nutrientes									
	g.Kg ⁻¹						mg.Kg ⁻¹			
	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
C ¹	5,62 a	1,95 ab	14,73 a	2,55 b	1,45 a	0,54 a	3,55 a	61,6 ab	50,55 a	19,475 a
T1 ²	5,01 a	1,41 bc	7,27 b	3,06 a	1,78 a	0,49 ab	3,33 ab	64,78 ab	47,15 a	14,55 b
T2 ³	5,55 a	1,26 c	7,27 b	2,61 b	1,65 a	0,41 b	3,35 ab	57,4 b	40,38 a	15,075 b
T3 ⁴	5,18 a	2,05 a	10,33 b	2,76 b	1,58 a	0,43 b	3,18 b	80,85 a	47,53 a	14,875 b

¹ Controle: somente meio de cultura;

² T1: composto pela linhagem RZ2MS9 – *Bacillus* sp.;

³ T2: composto pela linhagem RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*;

⁴ T3: Consórcio contendo as linhagens RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans*.

Na Tabela 10 são apresentados os resultados médios dos conteúdos de diferentes nutrientes presentes no sistema radicular das plantas de milho cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Através da comparação entre elas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, observa-se que a acumulação dos macronutrientes N, P, K e Mg, assim como a acumulação dos micronutrientes Cu, Mn e Zn, no sistema radicular das plantas de milho não foram influenciadas pelos tratamentos adotados. Entretanto, o acúmulo de Ca no sistema radicular foi superior quando as plantas foram cultivadas com inoculação do T1, o acúmulo de S no sistema radicular foi inferior quando as plantas foram cultivadas sem inoculação (controle) e o acúmulo de Fe foi superior em plantas cultivadas com inoculação do T1 ou sem inoculação (controle), de modo que o acúmulo destes não diferiram entre si a 5% de probabilidade.

Tabela 10 – Valores médios dos conteúdos dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), em g.Kg⁻¹, e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn), em mg.Kg⁻¹, presentes no sistema radicular das plantas de milho cultivadas em casa de vegetação submetidas aos tratamentos deste estudo. Dados seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tratamentos	Nutrientes									
	g.Kg ⁻¹						mg.Kg ⁻¹			
	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
C ¹	6,5 a	0,73 a	8,23 a	1,78 b	0,68 a	1,08 b	6,88 a	1277,5 a	46,03 a	32,2 a
T1 ²	5,49 a	0,86 a	6,89 a	2,68a	0,75 a	2,2 a	6,38 a	1543,75 a	51,33 a	24,6 a
T2 ³	6,09 a	0,69 a	7,46 a	1,91 b	0,73 a	1,94 a	4,68 a	583,35 b	32,25 a	23,225 a
T3 ⁴	5,18 a	0,75 a	10,52 a	1,78 b	0,63 a	1,55 a	5,43 a	600 b	41,58 a	26,45 a

¹ Controle: somente meio de cultura;

² T1: composto pela linhagem RZ2MS9 – *Bacillus* sp.;

³ T2: composto pela linhagem RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*;

⁴ T3: Consórcio contendo as linhagens RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans*.

4.9 Teste de antibiose entre as bactérias do consórcio

As linhagens que compuseram o tratamento T3 (RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans*), por terem tido um desempenho inferior ao T1 (composto apenas pela linhagem RZ2MS9 – *Bacillus* sp.) e ao T2 (composto apenas pela linhagem RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria*) foram submetidas a uma análise de antibiose para verificar possíveis interações negativas entre as mesmas, fato que explicaria seu desempenho reduzido. Entretanto, não foram observados halos de inibição em nenhuma das combinações testadas (Figura 20), de modo que as linhagens que compõem o T3 (consórcio) não inibem o crescimento uma das outras e seu desempenho reduzido na promoção de crescimento de milho pode ser explicado por outros mecanismos.

Figura 20 – Teste de antibiose entre as linhagens do consórcio (T3). Em A, B, C, D e E: 1 – RZ2MS9 (*Bacillus* sp); 2 – RZ1MS11 (*Burkholderia* sp.); 3 – RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*); 4 – RZ4MS18 (*Delftia acidovorans*); 5 – RZ1MS6 (*Burkholderia vietnamiensis*). Os números representados abaixo nas placas indicam a linhagem que foi inoculada no meio sólido

4.10 Transformação da linhagem RZ2MS16 com o plasmídeo pCM88

A eficiência de transformação da linhagem RZ2MS16 com o plasmídeo pCM88 foi de (total de colônias em todas as placas = 4764) transformantes. μg de DNA⁻¹. Foi observada *in vitro* a expressão da GFP pela linhagem RZ2MS16:*gfp* (Figura 21). A linhagem RZ2MS16:pCM88 apresentou alta estabilidade na expressão do gene da GFP *in vitro* após X gerações.

Figura 21 - Expressão heteróloga da *Green Fluorescent Protein* (GFP) pela linhagem RZ2MS16:*gfp*. Observação por esfregaço, aumento de 40X em microscópio óptico de fluorescência

4.11 Colonização de milho pela linhagem RZ2MS16:*gfp*

4.11.1 Microscopia óptica de fluorescência

O comportamento da linhagem RZ2MS16:*gfp*, durante a colonização de plântulas de milho cultivadas *in vitro* foi observada por Microscopia Óptica de Fluorescência (Figura 22).

Figura 22 – Observação da fluorescência da bactéria RZ2MS16:*gfp* sobre raízes de milho micropropagadas em meio MS. Cortes transversais de a) Controle e b) inoculado, 4 dias após inoculação com RZ2MS16:*gfp*; c) Controle e d) inoculado, 12 dias após inoculação com RZ2MS16:*gfp*. Escala: cada barra horizontal corresponde a 100µm

5 DISCUSSÃO

A partir da segunda metade do séc. XIX, Thomas Robert Malthus elaborou uma lei científica que afirmava que ‘enquanto o crescimento populacional obedeceria a uma progressão geométrica, o aumento da produção agrícola teria um ritmo apenas aritmético’. A consequência seria que somente as crises alimentares e a morte dos famintos conseguiriam adequar a satisfação das necessidades humanas às possibilidades produtivas da agropecuária (ABRAMOVAY, 2010). Na verdade, a fome era, e ainda é, provocada muito mais pela impossibilidade de acesso a alimentos existentes do que pela escassez absoluta na oferta. Mesmo que a fome no mundo atinja hoje a inadmissível cifra de quase um bilhão de pessoas (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 2009), isso representa menos de um sexto da humanidade, contra nada menos de um terço de famintos no início dos anos 1970. Entretanto, Malthus acertou num problema central: a elevação da produção material e da oferta de serviços encontra um claro limite no esgotamento da capacidade de os ecossistemas continuarem prestando os serviços de que depende a sobrevivência das sociedades humanas (ABRAMOVAY, 2010).

Mesmo que Malthus tenha subestimado o poder da tecnologia em enfrentar os limites da natureza e preconizado métodos hoje inadmissíveis para resolver o problema da fome, ele tocou num ponto central: o crescimento econômico encontra barreiras naturais que podem ser contornadas, mas não suprimidas (ABRAMOVAY, 2010). Isso significa que a extraordinária redução da fome nos últimos quarenta anos mostra-se menos promissora do que parece para o futuro. Aliás, esse declínio, que acontecia de forma contínua desde o final dos anos 1970, reverteu-se nos últimos dez anos: os 842 milhões de famintos de 1990 ampliaram-se hoje a mais de um bilhão (FAO, 2009).

É verdade que a agropecuária mundial é capaz de produzir a quantidade de alimentos necessária à plena satisfação das necessidades humanas. Mas, para que esse objetivo seja atingido e, sobretudo, para que o contingente de quase 2,3 bilhões de pessoas a mais que deverão povoar o planeta até 2050 (FAO, 2009) tenham suas necessidades alimentares satisfeitas, é indispensável que o próprio sistema alimentar mundial encontre novos caminhos (ABRAMOVAY, 2010).

Torna-se estratégico, portanto, o emprego de novas tecnologias que proporcionem aumentos em produtividade, que melhorem o aproveitamento dos recursos disponíveis, visando sustentabilidade dos sistemas agrícolas o que evita prejuízos ao ambiente.

A busca de soluções para aumentar a produção e diminuir a utilização de defensivos agrícolas pode estar presente na própria planta, como microrganismos associados à mesma que vivem no solo rizosférico, constituindo o principal reservatório de agentes microbianos que atuam na ciclagem de nutrientes (BERG et al., 2005) e que promovem o crescimento das plantas através da fixação biológica de nitrogênio, produção de substâncias reguladoras do crescimento, produção de antibióticos e sideróforos e solubilização de nutrientes como o fósforo (HAYAT et al., 2010).

Essas bactérias têm obtido grande aceitação e importância no mundo devido aos seus efeitos positivos sobre o crescimento das plantas e têm sido objeto de estudos devido aos efeitos benéficos produzidos em importantes culturas comerciais como alface (FREITAS et al., 2003; CIPRIANO, 2009), trigo (SALA et al., 2008; EGAMBERDIYEVA, 2005), arroz (ALAM et al., 2003; BENEDUZI et al., 2008), cebola (HARTHMANN et al., 2010), brachiaria (ARAÚJO, 2012), cana-de-açúcar (QUECINE, 2012; MOUTIA et al., 2010), canola (FARINA, 2012), feijão (FIGUEIREDO et al., 2008), milho, soja e algodão (ARAÚJO, 2008) entre outros (HAYAT, 2010).

Os cereais constituem a base da alimentação humana, contribuindo com cerca da metade da ingestão energética e protéica do ser humano (YOUNG; PELLETT, 1994). O milho, por sua vez, é o cereal mais consumido pela maioria das populações de vários países da América Latina, África e Ásia, constituindo-se a principal fonte energético-protéica desses povos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1988; BRESSANI 1991). Esse cereal tem grande importância econômica no Brasil, pois além de ser utilizado na alimentação humana é utilizado na alimentação animal e na indústria, sendo também produto de exportação (CERIGIOLI, 2005).

Entretanto, a produtividade do milho é limitada tanto pelos altos custos dos fertilizantes (principalmente nitrogenados e fosfatados) adicionados à cultura, quanto pela baixa eficiência dos mesmos. Somados a isso, os impactos desses fertilizantes no ambiente impedem o desenvolvimento sustentável da cultura.

Muitos estudos recentes alcançaram bons resultados de promoção de crescimento em milho pela inoculação de RPCP (LIMA, 2011; SZILAGYI-ZECCHIN, 2012; ARAÚJO, 2008; CHAVES, 2012; GHOLAMI et al., 2012; ARRUDA, 2012; DE MELLO, 2012; HAMEEDA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; ZUCARELI et al., 2011; MISHRA et al., 2011; SZILAGYI-ZECCHIN, 2012; CARDOSO et al., 2008; NAVEED et al., 2008. Em

vários países como o México, Argentina, Bélgica entre outros, são usados inoculantes de *Azospirillum* em plantios de milho (OKON, 1985).

No entanto, pouco foi investigado sobre o potencial de rizobactéria isoladas de outra espécie vegetal de promover o crescimento do milho. Bactérias isoladas de uma determinada planta podem colonizar hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade e promover o crescimento das mesmas (CERIGIOLI, 2005). Gomes et al. (2003) demonstraram que duas bactérias, *Bacillus thurigiensis* (C25) e *Bacillus pumilus* (C116), isoladas de plantas de couve, aumentaram o crescimento de alface cultivada em casa de vegetação (QUADTHALTMANN; KLOEPPER, 1996; MELLO et al., 2002). Isolados de *Pseudomonas* e *Arthrobacter*, sabidamente colonizadores do sistema radicular e estimuladores do crescimento de canola (*Brassica campestris* L. e *B. napus* L.), foram efetivos em incrementar a altura e biomassa de plantas de abeto (conífera comum na Europa) negro (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) e branco (*Picea glauca* (Moench) Voss) após a inoculação de raízes ou mudas (CHANWAY, 1997). Além disso, quando isolados selecionados por induzir resistência sistêmica na cultura do pepino e tomate foram empregados para inoculação de espécies de *Pinus*, observou-se efeito significativo na velocidade de germinação das sementes, na biomassa da parte aérea e no número de ramos por planta de *Pinus taeda* L. e no peso e altura da parte aérea de *Pinus elliottii* Engelm, a depender do isolado empregado (LIU et al., 1995; WEI et al., 1996).

A caracterização de rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro pode fornecer informações valiosas para o conhecimento da interação bactéria-planta de modo a reconhecer estratégias que podem beneficiar esta e outras culturas, já que os microrganismos associados a ele possui um potencial biotecnológico ainda inexplorado. Para isso, faz-se necessário identificá-las. O sequenciamento do gene 16S do rDNA tem cumprido essa finalidade conforme corroborado por tantos dados de literatura (RATÓN et al., 2011, PEREIRA et al., 2011; BENEDUZZI et al. 2008) como os apresentados neste estudo. Foi possível atingir a classificação ao nível de gênero para todas as linhagens bacterianas e ainda constatar propriedades associadas à promoção de crescimento vegetal que favorecem a seleção das rizobactérias.

Pela análise da diversidade rizobacteriana encontrada entre os isolados o guaranazeiro, podemos observar que 14 diferentes gêneros foram encontrados associados à rizosfera do guaranazeiro, sendo que a maioria pertence ao filo Proteobacteria, classe *betaproteobacteria*, gênero *Burkholderia*. O segundo filo mais abundante observado é o Firmicutes, representado, em sua maioria, por linhagens do gênero *Bacillus*. Apesar de o guaranazeiro ser uma

dicotiledônia, ele apresenta algumas similaridades com o milho em relação à abundância de alguns gêneros encontrados na rizosfera. Em estudos de diversidade da comunidade bacteriana do milho, Pedrinho (2009) relatou o predomínio dos gêneros *Bacillus* e *Burkholderia* em amostras de rizosfera de milho no Brasil. Esses resultados corroboram ainda aqueles obtidos por Cello (1997) e Lalande (1989) que observaram 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. Ikeda et al. (2012) relatou também a presença desses gêneros entre bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho. Em estudo realizado por Arruda (2012) foi relatado que *Burkholderia* foi um gênero encontrado em diferentes amostras em estudo de diversidade da comunidade bacteriana do milho no Rio Grande do Sul. McInroy e Kloepper (1995) reportaram que um dos gêneros bacterianos mais comumente isolados de raízes de milho doce foi *Burkholderia pickettii*. Liu et al. (2012) reportou, ainda, o predomínio quase exclusivo do gênero *Burkholderia* em bactérias endofíticas isoladas de sementes de milho, o que indica que esse gênero está associado a esta cultura desde o início de seu desenvolvimento. Além disso, em estudos de diversidade da comunidade não cultivável do milho (CHAUHAN et al. (2011) e CHELIUS (2001) foi encontrada também predominância do filo Proteobacteria.

As cinco linhagens selecionadas para teste de promoção de crescimento em casa de vegetação tiveram seu gene 16S rDNA completamente sequenciado e demonstraram resultados semelhantes aos encontrados no sequenciamento parcial do gene. Sequências parciais podem reduzir o tempo de análise e diminuir os custos do trabalho (SILVEIRA, 2004).

A semelhança entre a estrutura da comunidade rizobacteriana de milho e guaranazeiro indica uma semelhança na quantidade e qualidade de exsudatos radiculares dessas duas diferentes espécies de plantas, o que pode favorecer o estabelecimento das rizobactérias isoladas da segunda cultura quando inoculadas na primeira por apresentarem melhores condições para concorrer com a microbiota nativa, tanto pela adaptação às condições edafoclimáticas, quanto pelo aumento populacional promovido pela inoculação (SUMMER, 1990; ROESCH et al., 2005). A habilidade das rizobactérias em utilizar fontes de carbono específicas pode ser uma importante característica na seleção de microrganismos, que pode ser entendida como diversidade funcional, definida como número, tipos, atividades e taxas em que um conjunto de substratos é utilizado pela comunidade microbiana (ZAK et al., 1994).

Diferentes espécies de plantas pode diferir no grau e na maneira como influenciam a comunidade bacteriana na rizosfera. Smalla et al. (2001) observaram que as comunidades microbianas na rizosfera de batata e colza foram mais semelhantes entre si do que quando comparadas com a rizosfera de morango.

Esse fato é muito importante para produção de inoculantes bacterianos, pois quando um determinado isolado é introduzido na rizosfera, se ele for hábil em utilizar uma fonte de carbono dos exsudatos radiculares ou apresentar algum mecanismo que favoreça seu metabolismo na rizosfera, teria uma vantagem competitiva sobre as bactérias do solo sem essa habilidade. Dessa forma, o desenvolvimento das bactérias presentes no inoculante seria favorecido (LEMANCEAU et al., 1995).

Tendo em vista que o teste de um grande número de linhagens em condições naturais é extremamente laborioso, este estudo foi baseado em técnicas *in vitro* para a seleção das linhagens promissoras. 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 as linhagens foi realizada com o intuito de pré-selecionar aquelas que mais produziram o hormônio. Foi observado que 89% das bactérias são produtoras desse hormônio o que corrobora dados que estimaram que mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir esse regulador de crescimento ZAKHAROVA et al. (1999). Sabe-se que a maioria dos isolados de rizobactérias produz AIA na rizosfera de diferentes plantas, sendo que a grande variação não está tanto no número de produtores e sim na quantidade de AIA produzida (MORDUKHOVA et al., 1991 citado por CATTELAN, 1998).

Os valores de produção de AIA entre todas as linhagens variaram de $2,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $495,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Diversos trabalhos têm identificado linhagens bacterianas produtoras de AIA (KUKLINSKY SOBRAL et al., 2004, TSAVKELOVA et al., 2007). Halda-Alija (2003) reportou a existência dos gêneros *Burkholderia* e *Bacillus* entre isolados produtores de AIA isolados da rizosfera de *J. effusus* L.. A maioria dos relatos citam valores abaixo dos encontrados neste trabalho. No entanto, altos valores de produção de AIA também foram encontrados em estudos realizados por Castro (2011) em bactérias endofíticas isoladas do mangue (uma linhagem de *Exiguobacterium sibiricum* foi capaz de produzir $760,7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AIA).

A fixação biológica de nitrogênio pode ser considerada o segundo processo biológico mais importante do planeta, depois da fotossíntese (ALVES, 2007). Esse processo é de grande

importância econômica, pois o nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento da maioria das plantas de interesse comercial, e a fixação biológica acaba por tornar o sistema agrícola mais sustentável e produtivo.

Das 101 linhagens neste estudo, 23% foram capazes de crescer e formar película em meio livre de nitrogênio. A formação desta película é uma estratégia desenvolvida pelos microrganismos para regular a concentração de oxigênio no meio, com a finalidade de manter baixa a sua tensão (BRASIL, 2005); permitindo uma condição de crescimento bacteriano onde o oxigênio não influencia negativamente na sua sobrevivência, proporcionando uma melhor atividade da nitrogenase, que é extremamente sensível a altas concentrações de oxigênio (PELZER, 2010).

Embora seja uma metodologia que possibilite apenas qualificar as bactérias quanto a FBN *in vitro*, é um teste rápido e eficiente de avaliação utilizado nos laboratórios, pois em um meio livre de fonte nitrogenada e sob a condição semi-sólida, há um ambiente ideal para o desenvolvimento dos microrganismos e para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (SILVEIRA, 2008).

Para espécies vegetais como o milho, a FBN proporciona um acréscimo de 20 a 30% na aquisição de N (MOREIRA et al., 2010).

Das linhagens positivas para o teste de fixação de nitrogênio, a maioria pertence ao gênero *Burkholderia* que 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 (PEDRINHO, 2009).

Atualmente, se tem conhecimento de que algumas espécies de bactérias do gênero *Burkholderia* (ID 32008) associadas a plantas de cana-de-açúcar possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato inorgânico e promover o crescimento vegetal (PERIN et al., 2006; MENDES et al., 2007; LUVIZOTTO et al., 2010).

Estudos realizados com bactérias diazotróficas associativas como *Herbaspirillum* e *Burkholderia* mostraram que as mesmas possuem grande potencial de FBN quando associadas com plantas não leguminosas, como por exemplo, o arroz, milho, cana-de-açúcar, dentre outras (FERREIRA; GUIMARÃES; BALDANI, 2011; GUIMARÃES; BALDANI;

BALDANI, 2003; GUIMARÃES et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010, SILVA; REIS, 2009).

Pesquisadores brasileiros (WEBER, 1998; WEBER et al., 1999; WEBER et al., 2001), do grupo de J. Dobereiner identificaram, ainda, várias bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

O gênero *Burkholderia* apresenta ampla distribuição e é encontrado em associação com diversas plantas não leguminosas. A capacidade de algumas estirpes de *B. cepacia*, isoladas da rizosfera, de fixarem N₂ atmosférico, foi relatada por Bevivino et al. (1994). Porém, a primeira espécie de *Burkholderia* diazotrófica descrita foi de *B. vietnamiensis*, isolada de rizosfera de plantas de arroz cultivadas na Vietnã (GILLIS et al., 1995). Estudos posteriores mostraram o surgimento desse gênero em associação com o milho cultivado em diferentes regiões do Brasil e México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001).

No presente estudo, quase metade das linhagens foi capaz de solubilizar fosfatos (42,6%). As linhagens que apresentaram altos índices de solubilização de fosfato (ISF>3) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp.. Foi reportado que altas concentrações de bactérias solubilizadoras de fosfato são comumente encontradas em solo rizosféricos comparados a solo grosso (KESWANI et al., 1977).

De acordo com Mulder et al. (1969), dentre os principais mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato estão a produção de CO₂ e ácidos orgânicos. A produção desses ácidos demanda níveis mais altos de carboidratos do que o solo pode fornecer. Provavelmente essa é a razão porque a maioria das bactérias solubilizadoras é encontrada na rizosfera, onde o nível de carboidrato é alto (SPERBER, 1958).

Rodríguez e Fraga (1999) comprovam a capacidade dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Sphingobacteria*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em solubilizar fosfato inorgânico. A atividade *in vitro* de solubilização de fosfato tem sido também documentada para linhagens de *Burkholderia* sp. por Park et al. (2010). Song et al. (2008) isolou *Burkholderia cepacia* de solos cultivados na Coreia, e essas linhagens mostraram uma intensa atividade de solubilização de fosfato por produção de ácidos orgânicos. Souchie et al. (2005) relatam que o entendimento da capacidade e da eficiência de microrganismos em solubilizar fosfatos pode levar à seleção de linhagens com alto potencial de uso para a inoculação em plantas.

Bactérias solubilizadoras de fosfato tem um papel importante na nutrição das plantas. Seu uso como biofertilizante nas lavouras apresenta-se como uma importante contribuição para diminuição na utilização de compostos fosforados. Porém há poucos estudos sobre a

eficiência de tais bactérias neste processo e dos mecanismos envolvidos na interação destas com as plantas (BASHAN; HOLGUIM, 1998; VESSEY, 2003).

Sideróforos são quelantes de íons sintetizados por várias RPCP e desempenham um importante papel no crescimento de plantas seja diretamente, pelo suprimento de Fe para a planta, ou indiretamente, limitando o Fe disponível aos patógenos (GLICK, 1995). Das 101 linhagens do presente estudo, 23,7% apresentaram halos amarelados ao redor das colônias indicando produção de sideróforos, a maioria das linhagens positivas pertence ao gênero *Burkholderia* (87%). Arruda (2012) também reportou que a maioria das linhagens obtidas a partir de rizosfera de milho e que foram positivas para o teste de produção de sideróforos pertencem a esse gênero.

A partir dos resultados obtidos nos testes acima citados, foi possível selecionar 5 linhagens com potencial para promoção de crescimento de plantas. Estas tiveram seu gene 16S rDNA completamente sequenciados, sendo que foram identificados, algumas a nível de espécie, como: RZ1MS6 (*Burkholderia vietnamiensis*), RZ1MS11 (*Burkholderia* sp.), RZ2MS9 (*Bacillus* sp.), RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) e RZ4MS18 (*Delftia acidovorans*). As três primeiras apresentaram resultados positivos em todos os mecanismos testados, a linhagem RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) só não apresentou resultado positivo para o teste de solubilização de fosfato, mas apresentou uma produção relevante de AIA ($175 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e a linhagem RZ4MS18 (*Delftia acidovorans*) só apresentou resultado positivo no teste de produção de AIA, sendo produtor da maior concentração *in vitro* detectada entre as linhagens ($495,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Os efeitos das auxinas dependem de sua concentração e seu papel na promoção do crescimento deve ser mais complexo do que normalmente seria esperado. Geralmente, quando está em baixa concentração pode estimular o crescimento e quando em alta concentração pode ser inibitória até mesmo da germinação (ARSHAD; FRANKENBERG, 1991). Isso pode ocorrer em virtude do AIA microbiano modificar a auxina endógena da planta para um nível ótimo ou acima dele (PATTEN; GLICK, 1996). Estes fatos foram considerados por Sarwar e Kremer (1995), ao comparar a produção de auxinas entre bactérias promotoras e inibidoras do crescimento, verificando que as últimas produziram altos níveis e inibiram o crescimento da raiz de *Convolvulus arvensis*; Baranzani e Friedman (1999) observaram o mesmo efeito com *Lactuca sativa*. Araújo e Guerreiro (2010), trabalhando com *Bacillus*, constataram que a maioria dos isolados promotores de crescimento do milho não correspondiam aos maiores níveis de produção do AIA. A espécie *Pseudomonas Fluorescens*, cuja produção de AIA foi

de apenas 15,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, estimulou aumento do comprimento radicular em plantas de milho, segundo Hernandez-Rodriguez et al. (2008).

Entretanto, os testes *in vitro* ocorrem em condições muito diferentes das naturais, o que constitui a explicação mais fácil para a ausência de correlação com os testes *in vivo*. Yamada et al. (2003) relatam que a adição do precursor triptofano ao meio de cultura promove o aumento da síntese do AIA. Nos testes *in vitro* para avaliação da produção de AIA realizados no presente estudo, foi adicionado esse precursor ao meio de cultura; entretanto, em condições *in vivo*, este precursor não se encontra na mesma disponibilidade para a bactéria. Estudo realizado por Kravchenko et al. (1991) demonstra a baixa quantidade de L-triptofano que foi detectada em exometabólitos de raiz em comparação com as quantidades adicionadas aos meios sintéticos normalmente utilizados. Além disso, quando inoculada na planta, a bactéria pode sofrer competição por nutrientes, diminuindo seu potencial benéfico.

Neste estudo, foi escolhido para teste de promoção de crescimento em milho em casa de vegetação, a linhagem RZ4MS18 (*Delftia acidovorans*) com alto potencial de produção de AIA com o intuito de averiguar se seu efeito poderia ser diminuído em condições *in vivo* na planta, e assim ser produzida uma quantidade ideal que promovesse o crescimento vegetal.

No momento da bacterização das sementes, as mesmas foram previamente passadas por uma solução de sacarose que serve como um adesivo benéfico pela melhor distribuição e aumento na sobrevivência dos isolados nas sementes, resultando em melhor desempenho simbiótico com as plantas (BURTON, 1964; VINCENT, 1970; PERES et al., 1986; YASURIYAN et al., 1996). Burton (1976) descreveu a superioridade da mistura de inoculante com solução de sacarose em relação ao inoculante com água, relatando ter encontrado o maior índice de sobrevivência de rizóbios em sementes, quando foi utilizada uma solução de sacarose.

A colheita das plantas mantidas em casa de vegetação após inoculação das linhagens selecionadas foi realizada 30 e 60 dias após germinação das mesmas. Observando a variável altura, pôde-se observar que os tratamentos T1 (*Bacillus* sp.) e T2 (*Burkholderia ambifaria*) promoveram significativamente o crescimento das plantas de milho em relação ao Controle tanto aos 30 quanto aos 60 dias após a germinação. Entretanto, o tratamento T3 (Consórcio) não diferiu significativamente do Controle aos 30 dias levando até a uma redução significativa de 14,85% na altura aos 60 dias após germinação.

Fato semelhante foi observado para o peso seco dessas plantas analisadas aos 30 dias após germinação. As avaliações mostram aumento no peso seco tanto de parte aérea quanto de raiz pelos tratamentos T1 (*Bacillus* sp.) e T2 (*Burkholderia ambifaria*). No entanto o

tratamento T3 (Consórcio) não diferiu significativamente do controle tanto para parte aérea quanto para raiz. Já aos 60 dias após germinação, o tratamento T1 (*Bacillus* sp.) se destacou por aumentar o peso seco tanto de parte aérea (235,9%) quanto de raiz (247,8%) em relação ao controle, diferindo significativamente até mesmo do tratamento T2 (*Burkholderia ambifaria*), que também promoveu o crescimento de parte aérea (114,5%) e raiz (136,5%) em relação ao controle, porém em menor proporção, enquanto o tratamento T3 (Consórcio) não diferiu significativamente do controle tanto para parte aérea quanto para raiz.

A análise de nutrientes da parte aérea de plantas colhidas 60 dias após germinação revelou alteração significativa dos macronutrientes P, K, Ca e S entre os tratamentos, sendo que houve uma redução significativa de P pelo tratamento T2 (*Burkholderia ambifaria*) (vale salientar, aqui, que essa linhagem foi negativa para o teste de solubilização de fosfato), um aumento de K pelo Controle, aumento de Ca pelo tratamento T1 (*Bacillus* sp.) e diminuição de S pelos tratamentos T2 (*Burkholderia ambifaria*) e T3 (Consórcio). Entre os micronutrientes, foi observada alteração em Cu, Fe e Zn onde Cu apresentou redução significativa no acúmulo quando inoculada com o tratamento T3 (Consórcio), Fe apresentou redução significativa no acúmulo quando inoculada com o tratamento T2 (*Burkholderia ambifaria*) e Zn apresentou redução significativa no acúmulo quando inoculada com os tratamentos T1 (*Bacillus* sp.), T2 (*Burkholderia ambifaria*) e T3 (Consórcio).

A análise de nutrientes do sistema radicular de plantas colhidas 60 dias após germinação revelou alteração significativa somente nos macronutrientes Ca e S entre os tratamentos, sendo que houve um aumento significativo de Ca pelo tratamento T1 (*Bacillus* sp.) e de S pelos tratamentos T1 (*Bacillus* sp.), T2 (*Burkholderia ambifaria*) e T3 (Consórcio). Entre os micronutrientes, foi observada alteração somente em Fe, onde o Controle e o tratamento T1 (*Bacillus* sp.) apresentaram aumento significativo no acúmulo em relação aos tratamentos T2 (*Burkholderia ambifaria*) e T3 (Consórcio).

Portanto, a única correlação encontrada entre o acúmulo de nutrientes e o aumento no peso seco tanto na parte aérea quanto no sistema radicular foi para o macronutriente Ca no tratamento T1 (*Bacillus* sp.), que aumentou significativamente tanto o crescimento da planta (parte aérea e sistema radicular) quanto o acúmulo desse macronutriente quando analisadas as plantas 60 dias após germinação. O cálcio é um nutriente com papel preponderante no crescimento radicular das plantas (RITCHEY et al., 1982), o que repercute no crescimento da parte aérea; Segundo Karlen et al. (1988), o acúmulo de cálcio ocorre principalmente durante a fase vegetativa (85% do total), apesar de continuar por todo o ciclo de desenvolvimento.

Além da sua função como elemento estrutural constituinte da parede celular, tem também importante participação como mensageiro secundário, em resposta às mais diferentes condições de estresse. Em condições de deficiência de oxigênio, a variação na concentração desse cátion precede a expressão de genes que codificam peptídeos anaeróbicos (SUBBAIAH et al. 1994). A maior tolerância à baixa pressão de oxigênio está relacionada, portanto, com o metabolismo de parede celular, visto que o cálcio atua como elemento estrutural, conferindo maior resistência a essa parede (GRANT et al. 1973; DAMARTY et al. 1984). O Ca é ainda indispensável à germinação do grão de pólen, ao crescimento do tubo polínico e, consequentemente, à fecundação da flor (MARSCHNER, 1995).

Observando somente os resultados da análise dos nutrientes das plantas, podemos inferir também que os mecanismos de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de sideróforos observados no momento da seleção das linhagens mais promissoras, podem não ter tido influência no crescimento da planta já que não há uma correlação de incremento de nutrientes como o N, P e Fe naqueles tratamentos que tiveram os melhores resultados em casa de vegetação, ainda que não se possa desconsiderar o efeito de supressão de fitopatógenos pela produção de sideróforos bacterianos, e não somente pela disponibilização de ferro para a planta. Thakuria et al. (2004) relataram que é difícil indicar os mecanismos necessários à maior habilidade da bactéria em promover o crescimento da planta. Estes mecanismos de promoção de crescimento vegetal por rizobactérias não são completamente compreendidos e ainda precisam ser estudados, uma vez que diversos fatores, ainda não conhecidos, estão envolvidos (SOTTERO, 2003). Exemplo disso é o uso de RPCPs na indução de resistência sistêmica contra diferentes patógenos de plantas e que vem demonstrando bons resultados em determinadas condições de campo (WEI et al., 1991, 1996; LIU et al., 1995; VISWANATHAN e SAMIYAPPAN, 2002 a,b). Assim como outros mecanismos que não foram avaliados no presente trabalho como produção de outros hormônios reguladores vegetais, de enzimas hidrolíticas, e outros mecanismos que auxiliam no controle biológico de fitopatógenos como a produção de antibióticos e compostos voláteis como o HCN (TOMASHOW e WELLER, 1995; BAGNASCO et al., 1998).

Os resultados indicam crescimento expressivo das plantas de milho quando inoculadas com os tratamentos T1 (RZ2MS9 - *Bacillus* sp) e T2 (RZ2MS16 - *Burkholderia ambifaria*), sendo que o tratamento T1 (RZ2MS9 - *Bacillus* sp) ainda se destaca quando se analisam as plantas em um prazo maior. As duas linhagens que compõem esses tratamentos são produtoras de AIA, e a linhagem RZ2MS9 (*Bacillus* sp) produz uma concentração menor

(67,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) quando comparada a linhagem RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) (175,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A produção de AIA, neste caso, pode ter sido fundamental na promoção de crescimento observada em milho pela inoculação dessas linhagens. E a relação entre alta concentração produzida e um desempenho reduzido de crescimento se faz presente. Torna-se difícil determinar a concentração ótima de AIA que pode promover o crescimento vegetal (WAHYUDI et al., 2011).

Várias linhagens de RPCP, incluindo *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis* têm sido reportadas como sendo produtoras de auxinas (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al., 1996). Também tem sido relatado que o rendimento de trigo foi aumentado em até 43% com a inoculação de *Bacillus*, devido a algum hormônio de crescimento excretado tal como o ácido indol acético (AIA) (KLOPPER et al., 1991).

Vários isolados de *Bacillus* sp. obtidos a partir de estudos de Wahyudi et al. (2011) foram ainda capazes de produzir AIA constitutivamente, mesmo no meio de cultura sem suplementação de triptofano.

Foi verificada também, através de um teste de antibiose, uma possível interação negativa entre as linhagens pertencentes ao tratamento T3 (RZ1MS6 – *Burkholderia vietnamiensis*, RZ1MS11 – *Burkholderia* sp., RZ2MS9 – *Bacillus* sp., RZ2MS16 – *Burkholderia ambifaria* e RZ4MS18 – *Delftia acidovorans*), de modo a justificar seu desempenho reduzido. No entanto, não houve formação de halos de inibição entre nenhuma das linhagens, o que indica que os mesmos não produzem substâncias que inibem o crescimento dos demais em uma possível competição por nutrientes.

Logo, o desempenho reduzido do tratamento T3 (Consórcio) pode ser explicado devido a excessiva produção de AIA (495,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pela bactéria RZ4MS18 (*Delftia acidovorans*). Altas dosagens de ácido indol acético podem agir como agente herbicida, corroborando a colocação de Fachinello (1995) onde relata a ação herbicida quando usado AIA em altas concentrações.

O AIA pode ser produzido mesmo quando o L-triptofano não é adicionado ao meio já que as bactérias podem sintetizar L-triptofano ou sintetizar AIA por uma via independente do L-triptofano (ZAKHAROVA, et al, 1999; KUSS, et al, 2007), sendo que diferentes vias bioquímicas podem levar a diferentes quantidade de AIA sintetizado. Existem evidências de que os microrganismos podem selecionar uma via metabólica diferenciada, dependendo do ambiente (PATTEN; GLICK, 1996). As plantas podem obter AIA também pela oxidação do ácido 3-indolbutírico (AIB) ou por hidrólise de conjugados nos quais o AIA pode

eventualmente estar ligado como aminoácidos, açúcares ou peptídeos (WOODWARD; BARTEL, 2005).

No presente estudo, foi observado que um isolado do gênero *Bacillus* e um isolado do gênero *Burkholderia* tiveram a habilidade de promover o crescimento de milho. O incremento no sistema radicular, que é determinado no início do desenvolvimento da planta, logo após o plantio, influencia o desenvolvimento da parte aérea e propicia, como no caso do milho, um aumento no número de fileiras de grãos por espiga. Essas vantagens iniciais podem ou não, repercutir na colheita, o que dependerá das condições posteriores de desenvolvimento da cultura (DIDONET et al. 2000).

Bacillus é um dos gêneros mais promissores para serem usados em bioinoculantes comerciais devido à sua capacidade de formação de esporos, aumentando assim a adaptação da linhagem na formulação comercial e aplicação de campo (AYSHA, 2012). Entre os *Bacillus*, as linhagens de *B. subtilis* são as mais amplamente utilizadas como promotoras de crescimento devido a sua capacidade de reduzir doenças pela produção de antibióticos quando aplicadas em sementes. O gênero *Bacillus* é relatado como promotor de crescimento em algumas culturas. Araújo (2008) observou que *B. subtilis* promoveu crescimento e disponibilização de nutrientes para o milho em experimento de casa de vegetação. Araújo e Hungria (1999) concluíram que *B. subtilis* (AP-3) ou seus metabólitos proporcionaram incrementos na nodulação e rendimento da soja no campo. Foi constatado também que essa mesma estirpe também produz hormônios vegetais e antibióticos (ARAÚJO et al., 2005).

Foi demonstrado que duas espécies de *Bacillus* (*B. pumilus* e *B. licheniformis*) isoladas da rizosfera de *Alnus glutinosa* tiveram forte atividade promotora de crescimento (PROBANZA et al., 1996). Logo foi constatado que ambos eram produtores de auxinas (GUTIÉRREZ-MAÑERO et al. 1996).

Lim e Kim (2009) descreveram a capacidade de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*, produtores de auxinas, sideróforos e solubilizadores de fosfato insolúvel na promoção de crescimento de pimentão vermelho e tomate. O mesmo foi feito por Wahyudi et al. (2011) demonstrando crescimento significativo de plântulas de soja por linhagens de *Bacillus* sp. isoladas da rizosfera das mesmas, portanto potenciais promotoras de crescimento para serem utilizadas como bioinoculantes.

Resultados obtidos pela inoculação de *B. vietnamiensis* em arroz (TRAN VAN et al., 2000) e *B. ambifaria* em milho (CICCILLO et al., 2002) tem mostrado o ótimo potencial de *Burkholderia* como rizobactéria promotora de crescimento vegetal. Tem-se verificado uma grande variabilidade nos resultados nas mais diversas culturas testadas, sendo que a média de

incremento no rendimento situa-se em torno de 20 a 30% (REIS, 2004), valores bem abaixo do que foi encontrado no presente estudo.

Em estudo de inoculação com *Burkholderia* em plantas de arroz, Baldani et al. (2000), relataram que a biomassa da planta aumentou 69%, e que 31% foi devido ao processo de FBN. Alves (2007) verificou que a inoculação de estirpes do gênero *Burkholderia* e *Herbaspirillum* contribuiu com 34% do N absorvido em plantas de milho. Atualmente, mais interesse tem sido dado ao estudo dessas bactérias, pois sua ocorrência nos tecidos de plantas de milho tornou estas bactérias promissoras principalmente para o suprimento de nitrogênio nos sistemas agrícolas (ARRUDA, 2012).

Balldotto et al. (2010) observaram incrementos de 102% no crescimento da parte aérea e 81% no crescimento de raiz em abacaxizeiros ‘Vitória’ com a aplicação de *Burkholderia* spp quando comparado ao controle, durante aclimatização em casa de vegetação. Esse efeito foi ainda pronunciado quando a bactéria foi aplicada associada a ácidos húmicos.

Os efeitos positivos exibidos por *Burkholderia* sp. não estão somente restritos aos mecanismos que aumentam a disponibilidade de nutrientes para as plantas mas também exibem potencial considerável para biocontrole (CABALLERO-MELLADO et al., 2007; HERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2008). Não obstante, os tratamentos bacterianos do presente trabalho mostraram respostas positivas em milho em condições de casa de vegetação. Este resultado demonstrou que as linhagens bacterianas utilizadas neste estudo foram não planta-específicas, e elas estimularam o crescimento do milho.

Visando o monitoramento da colonização desses microrganismos promotores de crescimento em milho, umas das linhagens que apresentou alto desempenho em casa de vegetação (RZ2MS16 - *Burkholderia ambifaria*) foi transformada com o plasmídio pCM88 e passou a expressar o gene da GFP quando estimulada por luz UV. Essa linhagem (então chamada RZ2MS16:*gfp*) foi inoculada nas plantas de milho e cortes transversais de suas raízes foram observados por microscopia óptica de fluorescência aos 4 e 12 dias após inoculação. Nas observações aos 4 dias, comparando os cortes das plantas controle (não inoculadas) com os cortes das plantas inoculadas podemos observar uma fluorescência maior na epiderme e exoderme das raízes de plantas inoculadas, o que sugere uma concentração maior da linhagem RZ2MS16:*gfp* nessas regiões, possivelmente formando biofilmes. Nas observações aos 12 dias após inoculação, essa maior fluorescência ‘desloca-se’ para o cilindro central da raiz da planta inoculada e fica evidente a colonização do apoplasto radicular por essa linhagem, inclusive do apoplasto de células ao redor dos vasos do xilema e floema. Essas

observações indicam que a bactéria entra na planta pela epiderme da raiz e migra até o cilindro central, onde possivelmente se insere em algum vaso condutor e coloniza sistematicamente a planta. Para uma colonização eficiente do interior da planta, a habilidade para colonizar a rizosfera é quase que um pré requisito (DANHORN, FUQUA, 2007). Apesar de as RPCPs colonizarem todos os órgãos vegetais, no sistema radicular são encontradas em maior densidade, por, geralmente, ser o primeiro local de colonização (SCHULZ; BOYLE, 2006). Contudo, estas bactérias podem se translocar do sistema radicular para outros órgãos através dos vasos do xilema, durante o desenvolvimento do vegetal (COMPANT et al., 2010; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Os biofilmes bacterianos são encontrados em muitas plantas como estratégia de colonização da filosfera e da rizosfera (KNEE et al., 2001). As bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que fitopatógenos, essa capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADTHALLMANN; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997), vasos condutores (MAHAFFEE et al., 1997; HALLMANN et al., 1997) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADTHALLMANN; HALLMANN, KLOEPPER, 1997). Com esta colonização sistêmica da planta, estas bactérias podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006). Essa estratégia de colonização é a chave para a sobrevivência e dominância desses microrganismos na planta hospedeira, visto que a localização em ambientes protegidos da superfície da planta e estruturas de biofilmes podem aumentar a resistência a estresses (MORRIS; MONIER, 2003).

O estabelecimento bacteriano na rizosfera é também uma condição fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta. Além disso, é necessário que a bactéria se espalhe ao longo da raiz e não perca a capacidade de sobreviver e multiplicar-se de maneira competitiva em relação à comunidade nativa (WELLER; ZABLOTOWICZ, 1987).

Não somente o desenvolvimento de métodos microscópicos, mas também a utilização de sondas fluorescentes, hibridização fluorescente *in situ* e a utilização de genes repórter, como o gene da *Green Fluorescent Protein* (GFP) têm auxiliado no avanço desses estudos (WAGNER; HORN; DAIMS, 2003). Genes marcadores, como a GFP, têm sido utilizados amplamente para demonstrar a colonização de isolados bacterianos endofíticos em diversas culturas como *Pseudomonas chlororaphis* em sorgo (TOMBOLINI et al., 1999), *Klebsiella pneumoniae*, colonizando o córtex e espaços intercelulares de milho (CHELIUS; TRIPLETT, 2001), *Herbaspirillum* sp. colonizando *Oryza officinalis* (ELBELTAGY et al., 2001) e

Klebsiella pneumoniae colonizando vasos do xilema em *Catharantus roseus* e *Citrus cinensis* (LACAVA, ARAUJO; AZEVEDO, 2007).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados utilizados no ensaio in vivo, *Bacillus* sp e *Burkholderia ambifaria* promoveram o aumento de peso seco de raiz e da parte aérea de plantas de milho e demonstraram ter potencial na utilização como inoculantes

Em uma próxima etapa, será analisado o efeito das rizobactérias que demonstraram bons resultados no presente estudo quando inoculadas em outras culturas de interesse comercial, inclusive no próprio guaranazeiro. Assim como o efeito do consórcio (T3), sem a linhagem RZ4MS18 (*Delftia acidovorans*), no crescimento do milho e das demais culturas testadas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVAY, R. Alimentos *versus* população: está ressurgindo o fantasma malthusiano? **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, p. 38-42, 2010.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiology Research**, New York, v. 163, p. 173-181, 2008.
- ALAM, M.S.; CUI, Z.; YAMAGISHI, T.; ISHI Rice cultivar variation in the growth response to inoculation of free-living rhizobacteria. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 6, p. 50-51, 2003.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, B.R.J.; DODDEY, R.M.; URGUAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 1-9, 2003.
- ALVES, G.C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 65p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2007.
- AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 26, p. 241-248, 2002.
- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impacto f genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L.; Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ÂNGELO, P.S.; NUNES-SILVA, C.G.; BRIGIDO, M.M.; AZEVEDO, J.S.N.; ASSUNÇÃO, E.N.; SOUSA, A.R.B. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Report**, Berlin, v. 27, p. 117-124, 2008.
- ANTOUN, H; PRÉVOST, D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: SIDDIQUI, Z.A. (Ed.). **PGPR: Biocontrol and biofertilization**, Netherlands: Springer, 2005. p. 1-38.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, p. 57-67, 1998.

ARAÚJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 456-462, 2008.

_____. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria Brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 3, p. 521-527, 2012.

ARAÚJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 837-844, 2010.

ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/B. *elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1633-1643, 1999.

ARAÚJO, F.F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 1639-1645, 2005.

ARAÚJO, I.B.; RESENDE, A.V.; FURTINI NETO, A.E.; ALVES, V.M.C.; SANTOS, J.Z.L. Eficiência nutricional do milho em resposta a fontes e modos de aplicação de fósforo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, p. 27-39, 2003.

ARAÚJO, L.A.N.; FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n. 39, p. 771-777, 2004.

ARRUDA, L.M. **Seleção e caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento de milho cultivadas no Rio Grande do Sul**. 2012. 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ARSHAD, M.; FRANKENBERG, W.T. Microbial production of plant hormones. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 133, p. 1-8, 1991.

_____. Microbial production of plant growth regulators. In: BLAINE, F.; METTING, J.R. (Ed.). **Soil Microbial Ecology**. New York: Marcel and Dekker Inc., 1993. p. 307-347.

_____. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, New York, v. 62, p.45-151, 1998.

ASSUMPÇÃO, L.C. **Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico**. 2008. 93p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AYSHA, O.S.; AYSHA, O.S.; VINOTHKUMAR, P.; VASUKI, S.; VALLI, S.; NIRMALA, P.; REENA, A. PGPR *Bacillus* species isolated from tomato plant-A comparative study on coconut water enrichment. **International Journal of Bioassays (IJB)**, Nova Delhi, v. 1, n. 11, p. 131-137, 2012.

BAGNASCO, P.; DE LA FUENTE, L.; GUALTIERI, G.; NOYA, F.; ARIAS, A. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, n. 10/11, p. 1317-1322, 1998.

BAIS, H., P.; WEIR, T., L.; PERRY, L., G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 2333-266, 2006.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.

BALDOTTO, L.E.; BALDOTTO, M.A.; CANELLAS, L.P.; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVARES, F.L. Growth promotion of pineapple 'vitória' by humic acids and *burkholderia* spp. during acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 34, n. 5, 2010.

BANNANTE, C.A. Economic evaluation of the use of phosphate fertilizers as a capital investment. In: JOHNSTON, A.E.; SYERS, J.K. (Ed.). **Nutrient management for sustainable crop protection in Asia**. Wallingford, UK: CAB International, 1998. 409p.

BARANZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 10, p. 2397-2406, 1999.

BAREA, J.M.; NAVARRO, E.; MONTOYA, E. Production of plant growth regulators by rhizospheric phosphate-solubilizing bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 40, p. 129-134, 1976.

BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCO'N, R.; AZCON'N-AGUILAR, C. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1761- 1778, 2005.

BARKEN, K. B.; HAAGENSEN, J. A. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 384, p. 1-11, 2007.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 2043-2050, 2000.

BASHAN, Y.; HOLGUIM, G. Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol – PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, p. 1225-1228, 1998.

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

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

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 11, p. 1673–1685, 2005.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, n. 4, p. 399-406. 1976.

BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.V.; DEL GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacea*. **Microbiology**, New York, n. 194, p. 1068-1077, 1994.

BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 27, p. 225-237, 1998.

BHATTACHARJEE, R.B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. **Applied and Microbiological Biotechnology**, New York, v. 80, p. 199-209, 2008.

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

BONATELLI, M.L. **Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose**. 2012. 84p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BOTELHO, G.R.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescentes* na supressão de doenças de plantas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 31 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 211).

BRAGA, N.R.; MASCARENHAS, H.A.A.; BULISANI, A.; RAIJ, B.V.; FEITOSA, C.T.; HIROCE, R. Eficiência agronômica de nove fosfatos em quatro cultivos consecutivos de soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 4, p. 315-319, 1991.

BRASIL, M.S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 2005. 136p. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

BRESSANI, R. Protein quality of high lysine maize for humans. **American Association of Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 36, n. 9, p. 806- 811, 1991.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 2, p. 535-538, 1991.

BRILL, W.J. Biological nitrogen fixation. **Scientific American**, New York, v. 236, p. 68-81, 1977.

BRINGHURST, R.M.; CARDON, Z.G.; GAGE, D.J. Galactosides in the rhizosphere: Utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 8, p. 4540-4545, 2001.

BROEK, A.V.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins upregulate expression of indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, p. 1338-1342, 1999.

BROWN, L. Intervenção na mesa-redonda sobre Improving Natural Resources to Feed the World: Prerequisites for Sustainable Agriculture, In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL, 1995. Washington. **A 2020 vision for food agriculture and the environment**, Washington: IFPRI, 1995. p. 75-79.

BURTON, J.C. *Rhizobium* - legume association. In: GILMOUR, G.M.; ALLEN, N., Eds. **Microbiology and soil fertility**. Oregon: Bibliographic Series, 1964. p. 107-134.

BURTON, J.C. Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: NUTMAN, P.S., (Ed.). **Symbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge: University Press, 1976. p. 175-189.

BUYER, J.S.; LEONG, J. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains, **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 261, n. 2, p. 791-4. Jan. 1986.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., a N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5308-5319. 2007.

CAMARGO, M.C.R.; TFOUNI, S.A.V.; VTORINO, S.H.; MENEGÁRIO, T.F. Determinação de hidrocarbonetos poliscíclicos aromáticos (HPAS) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). **Ciência Tecnológica de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 230-234. 2006.

CANHOS, V.P.; COUTINHO, H.L.C.; VAZOLLER, R.; RUMJANEK, N.; ROSADO, A.; BARROS, E.; AZEVEDO, J.L.; PELLIZARI, V.; MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J.O.; MORAIS, G.; SCHENBERG, A.C. **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica: Microrganismos e Biodiversidade de solos**. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt10>>. Acesso em: 02 fev. 2004.

CANTARELLA, H. Calagem e adubação do milho. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. Cap. 6, p. 147-196.

CARDOSO, I. C. M.; MARIOTTO, J. R.; KLAUBERG FILHO, O.; SANTOS, J. C. P.; FELIPE, A. F.; NEVES, A.N.; MIQUELUTTI, D. J. Resposta de milho (*Zea mays* L.) precoce à inoculação de rizobactérias em casa-de-vegetação. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 28., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: SBCS, 2008. CD Rom.

CARVALHO NETTO, O.V. **Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16S rDNA**. 2007. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CASTRO, V.L.S.S.; MELO, I.S. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos à *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, São Paulo, v. 2, p. 1-5, 2007.

CASTRO, R.A. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada aos manguezais de Cananéia e Bertioga – SP**. 2011. 93p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2011.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 139)

CATTELAN, A.J. **Screening and characterization of soil and rhizosphere bacteria for traits that promote early soybean growth**. 1998. 89p. Tese de Doutorado – University of Georgia, Georgia, 1998.

CELLO, F.D.; BEVIVINO, A.; CHIARNI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, V.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4485-4493, 1997.

CENTRO DE PESQUISA AGROFLORESTAL DA AMAZÔNIA OCIDENTAL (CPAA). **O que é o guaraná?** Disponível em <<http://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/guarana/docs/oque.html>>. Acesso em: Jan. 2008.

CERIGIOLI, M.M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 149p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 2005.

CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with PGPR soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, Lawrence, v. 43, p. 99-112, 1997.

CHAUHAN, P.S.; CHAUDHRY, V.; MISHRA, S.; NAUTIYAL, C.S. Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, n. 51, p. 15-32, 2011.

CHAVES, D.P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, A.; BALAN, L.C. Fontes de P associadas à rizobactérias no desenvolvimento radicular do milho: área e diâmetro. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: IAC. 2012. Resumo 77.

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

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolates from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

CICCILLO, F.; FIORE, A.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Effect of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI7 on plant growth and rhizospheric bacteria diversity. **Environmental Microbiology**, Oxford, n. 4, p. 238-245, 2002.

COELHO, L.F. **Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes Rizosferas**. 2006. 71p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo, Campinas, 2006.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2012**. Brasília: CONAB, 2012. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>>>. Acesso em: 08 abr. 2012.

COMPANT, S.; CLEMENT, S.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, n. 30, p. 669-678. 2010.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Defesa Florestal, 1984, v. 4, 172p.

CIPRIANO, M.A.P. **Potencial de *Pseudomonas* spp na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico**. 2009. 57p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo, Campinas, 2009.

CRICHTON, R.R.; WARD, R.J. Iron species in iron homeostasis and toxicity. **Analyst**, London, v. 120, p. 693-697, 1995.

DAMARTY, M.; MORUAN, C.; THELLIER, M. Calcium and Cell. **Plant cell Environmental**, Oxford, v. 7, p. 441 - 448, 1984.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 61, p. 401-422, 2007.

DE FREITAS, J.R.; BANERJE, M.R.; GERMIDA, J.J.; Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, p. 358-364, 1997.

DE MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. 2012. 98p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2012.

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

DIDONET, A. D.; LIMA, O. S.; CANDATEN, A. A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 2, 2000.

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

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 771-774, 1997.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa, SPI, 1995. 60p.

DUARTE, J.O. **Introdução e importância econômica do milho** – 2002. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/milho/cultivodomilho/importancia.htm>>. Acesso em: 04 nov. 2006.

DVORNIKOVA, T.P.; SKRIABIN, G.K.; SUVOROV, N.N. Enzymatic transformation of tryptamine by fungi. **Mikrobiologiya**, Moskva, v. 39, p. 42-6, 1970.

EGAMBERDIYEVA, D. Plant growth promoting rhizobacteria isolated from a calisol in semi-arid region of Uzbekistan: biochemical characterization and effectiveness. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, n. 168, p. 94-99, 2005.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5285-5293, 2001.

ENEBAK, S.A., WEI, G. E KLOPPER, J. W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, Lawrence, n. 44, p. 141-143, 1998.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALLES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 67, p. 2790-2798, 2001.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMAN, A; NACHITIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 1995. 178 p.

FARIA, J.J.P. **Manual de Produção do Guaraná**. Cuiabá: SEBRAE, 2000. 122 p.

FARINA, F. **Diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura de canola** (*Brassica napus* L.) cultivada no município de Vacaria, Rio Grande do Sul. 2012. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

FERREIRA, J.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, Brasília, v. 7, n. 13, p. 826-833, 2011.

FIGUEIREDO, M.V.B.; MARTINEZ, C.R.; BURITY, H.A.; CHANWAY, C.P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 1187-1193. 2008.

FIGUEIREDO, M.V.B.; LIRA JUNIOR, M.A.; MESSIAS, A.S.; MENEZES, R.S.C. Potential impact of biological nitrogen fixation and organic fertilization on corn yield in low external input systems In: DANFORTH, A.T. (Ed.). **Corn crops production: growth, fertilization and yield**. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 239-267.

FIGUEIREDO, M.V.B. SELDIN, L.; ARAUJO, F.F.; MARIANO, R.L.R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.) **Plant growth and health promoting bacteria**. 1ª ed. Berlin: Springer-Verlag, 2010. v. 18, p. 45-68.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2009. **Global agriculture towards 2050**. High level expert forum. Roma, 12 e 13 de outubro. Disponível em <http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf>, última consulta 25/07/2010>. Acesso em: Out. 2012.

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

FREITAS, S.S. **Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos**. 1994. 112 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

_____. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. **Microbiologia do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. p. 1-20.

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

FRIDLENDER, M., INBAR, J., CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a β -1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1211-221, 1993.

FROEHLICH, D.M.; FEHR, W. R. Agronomic performance of soybeans with differing levels of iron deficiency chlorosis on calcareous soil. **Crop Science**, Madison, v. 21, p. 438-441, 1981.

FUKUMASU, H.; SILVA, T.C.; AVANZO, J.L.; LIMA, C.E.; MACKOWIAK, I.I.; ATROCH, A; SPINOSA, H.S.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L.Z. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* mart var. *Sorbilis*, the guarana, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, Amsterdam, n. 233, p. 158-64, 2006.

GARCÍA, F.P. Fertilización del fresón. In: Subdirección General de Social y Medios El fresón. **Aspectos técnicos y perspectivas**. Valencia: Caia Rural, 1993. p. 39-57 (Cuadernos de Agricultura, 1).

GARCÍA, J. A. L.; SCHLOTER, M.; DURKAYA, T.; HARTMANN, A.; MAÑERO, F.J. G. Colonization of pepper roots by a plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 381-385, 2003.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. **Springer- Verlag**, New York, 2004.

GAUDIN, V.; VRAIN, T.; JOUANIN, L. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, p. 11-28. 1994.

GAUR, A.C. Physiological functions of phosphate solubilizing microorganisms. In: GAURM A.C. (Ed.), **Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers**. New Delhi: Omega Scientific Publishers, 1990. p. 16-72.

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.; van ELSAS, J.D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Berlin, v. 38, p. 1-15, 1999.

GHOLAMI, A.; BIYARI A.; GHOLIPOOR, M.; RAHMANI, H. A. Growth Promotion of Maize (*Zea mays* L.) by Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria under Field Conditions, **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, n. 43, v. 9, p. 1263-1272, 2012.

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

GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 699-703, 2003.

GONÇALVES, J.L.M.; SANTARELLI, E.; MORAES NETO, P.; MANARA, M.P. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 310-350.

GONZALEZ-LOPEZ, J.; RODELAS, B.; POZO, C.; SALMERÓN-LÓPEZ, M.V.; SALMERÓN, V. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. **Amino Acids**, Wien, v. 28, p. 363-367, 2005.

GILLIS, M.V.; TRAN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, K.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *B. vietnamiensis* sp. Nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ottawa, n. 45, p. 274-289, 1995.

GRALL, S.; MANCEAU, C. Colonization of *Vitis vinifera* by a Green Fluorescent Protein-Labeled, GFP-Marked Strain of *Xylophilus ampelinus*, the Causal Agent of Bacterial Necrosis of Grapevine, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n.4, pp. 1904-1912, 2003.

GRANT, G. T.; MORRIS, D. A.; REES, P. J. P.; SMITH, K. A. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 195-198, 1973.

GRAHAM, P.H.; VENCE, C.P. Legumes: importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 131, n. 3, p. 872-877. 2003.

- GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, n. 37, p. 395 – 412, 2005.
- GRUSAK, M.A.; PEARSON, J.N.; MARENTES, E. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 60, p. 41-56, 1999.
- GUERINOT, M.L.; Microbial iron transport. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 743-772, 1994.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 03, p. 393-398, 2007.
- _____. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, Goiânia, v. 23, n. 04, p. 32-39, 2010.
- GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J.; ACERO N; LUCAS, J.A.; PROBANZA, A. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth. II. Characterization and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, n. 182, p. 67–74. 1996.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; NATARAJAN, M.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 2634-2645, 2001.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POODEL, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L., **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, 2003.
- HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.
- HAMEEDAA, B.; HARINIB G.; RUPELAO.P. B; WANIS.P. B; GOPAL REDDY Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, p. 234-242, 2008.
- HARTHMANN, O.E.L., MÓGOR, A.F.; WORDELL FILHO, J.A.; DA LUZ, W.C. Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 462-465, fev. 2010.

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

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

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HUBBEL, D.H.; KIDDER, G. **Biological nitrogen fixation**. University of Florida: IFAS Extension, SL16, 2003. p. 1-4.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, n. 5, p. 387-394, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K. (Ed.) **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press LLC, 2006. p. 43-93.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, Cibinong, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2003.

IKEDA, A.C.; BASSANI, L.L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V.K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M.B.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L.V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Plant Microbe Interactions*. **Microbial Ecology**, New York, DOI 10.1007/s00248-012-0104-0. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). 2011. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 03 mar. 2012.

KARLEN, D.L.; FLANNERY, R.L.; SADLER, E.J. Aerial accumulation and partitioning of nutrients by corn. **Agronomy Journal**, Madison, n. 80, p. 232-242, 1988.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agriculture soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, p. 75-86, 1995.

KESWANI, C.L.; KIBANI, T.H.M.; CHOWDHURY, M.S., 1977. Effect of intercropping on rhizosphere population in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* Merrill). **Microbial Ecology**, New York, v. 3, p. 363-368.

KIM, K.Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and fertility of Soils**, Berlin, v. 26, p. 79-87, 1998.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZ, M.; SCHORTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth rhizobacteria. **Nature**, London, v. 286, p. 885-886, 1980.

KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICZ, R.M.; TIPPING, E.M.; LIFSHITZ, R. Plant growth promotion by bacterial rhizosphere colonizers. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Eds.) **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht : Kluwer Academic Publishing, 1991. pp. 315-326.

KNEE, E.M.; GONG, F.C.; GAO, M.S.; TEPLITSKI, M.; JONES, A.R.; FOXWORTHY, A.; MORT, A.J.; BAUER, W.D. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 6, p. 775-784, 2001.

KRAVCHENKO, L.V.; BOROVKOV, A.V.; PSHIKVIL, Z. The possibility of auxin biosynthesis in wheat rhizosphere by associated nitrogen-fixing bacteria. **Microbiology**, New York, n. 60, p. 927-931. 1991.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion, **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUKOSKI, E.M.; ROSEANE, F.; TRONCOSO, G.A.M. Propriedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista de La Facultad de Química Farmacêutica**, Madrid, v. 122, n. 2, p. 45-52. 2005.

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, Out. 2007.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Evaluation of endophytic colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* seedlings by endophytic Bacteria. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, n. 1, p. 11-14, 2007.

LALANDE, R.; BISSONNETTE, N.; COUTLÉÉ, D.; ANTOUN, H.; Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant growth promoting potencial. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 115, p. 7-11, 1989.

LAVIE, S.; STOTZKY, G. Interactions between clay minerals and siderophores affect the respiration of *Histoplasma capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 1, p. 74-79, 1986.

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptophan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 629, p. 255-266, 1993.

LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J.M.; ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1004-1012, 1995.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual review phytopathology**, Palo alto, n. 24, v. 187-209, 1986.

LIM, J.H.; KIM, S.D. Synergistic Plant Growth Promotion by the Indigenous Auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, Seoul, v. 52, n. 5, p. 531-538, 2009.

LIMA, F.F. NUNES, A.P.L.; FIGUEIREDO, M.V.B.; DE ARAÚJO, F.F.; LIMA, L.M.; DE ARAPUJO, A.S.F. *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Viçosa, v. 6, n. 4, Out.-Dez, 2011, pp. 657-661.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1064-1068, 1995.

LIU, Y. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. **World Journal of Microbiol Biotechnol**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 391-6, 2012.

LUNA, M.F.; GALAR, M.L.; APREA, J.; MOLINARI, M.L.; BOIARDI, J.L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, n. 32, p. 1071-1076, 2010.

LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A. A. C.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, p. 1829-1836, mar. 2010.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo: RAPP, 1996. v. 4, p. 1-49.

_____. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 16-20, 2001a.

_____. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 597-600, 2001b.

MAGAZIN, M.D.; MOORES, J.C.; LEONG, J. Cloning of the gene coding for the outer membrane receptor protein for ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth-promoting *Pseudomonas* strain. **The journal of Biological Chemistry**, Bethesda, n. 261, v. 2, p. 795-9, Jan. 1986.

MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DER WOLF, J.M.; VAN DEN BRINK, M. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89b-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, P.M.; BOWEN, G.D. **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. Melbourne: CSIRO, 1997. p. 180.

MAIDAK, B.L.; COLE, J.R.; PARKER JUNIOR, C.T.; GARRITY, G.M.; LARSEN, N.; LI, B.; LILBURN, T.G.; MCCAUGHEY, M.J.; OLSEN, G.J.; OVERBEEK, R.; PRAMANIK, S.; SCHMIDT, T.M.; TIEDJE, J.M.; WOESE, C.R. A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, n. 1, p. 171-173, 1999.

MAJHENIC, L.; KERGET, M.S.; KNEZ, Z.E. Antiozidant and antimicrobial activity of Guarana seed extract. **Food Chemistry**, London, n. 104, p. 1258-68. 2007.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de Ácido Indol Acético e Derivados por Bactérias Fixadoras de Nitrogênio**. 2005. 75p. (Tese) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

MARSCHER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press., 1995. 889 p.

MARTINS, N.G.S. **Os fosfatos na cana-de-açúcar**. 2004. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

MARX, J. The roots of plant-microbe collaborations. **Science**, Washington, v. 304, n. 5668, p. 243-206. 2004.

MARX, C.J.; LIDSTROM, M.E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2065-2075, 2001.

MCLNROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, n. 41, v. 895-901. 1995.

MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; REIS, V.M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, The Hague, n. 279, p. 141-152. 2006.

MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CAMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, p. 222-228, 2002.

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

- MELO, M.R.F.; MARIANO, R.L.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R.; ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento de mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 28, p. 222-228, 2002.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Endophytic bactéria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, 2007.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 4ª ed. Worblaufen-Bern: International Potash Institute, 1987, 687 p.
- MILA, I.; SCALBERT, A.; EXPERT, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and roots. **Phytochemistry**, New York, v. 42, p. 1551-1555, 1996.
- MILHO. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/milho>>. Acesso em: 15 out. 2010.
- MISHRA, A.; CHAUHAN, P.S.; CHAUDHRY, V.; TRIPATHI, M.; NAUTIYAL, C.S. Rhizosphere competente *Pantoea agglomerans* enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth without altering the rhizosphere functional diversity. **Springer**, Netherlands, v. 100, p. 405-413. 2011.
- MORAES, M.L.L.; MICKE, G.A.; FUJIYA, N.M.; TAVARES, M.F.M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Analytica**, Rio de Janeiro, n. 5, p. 44-50. 2003.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. p. 407-447.
- MOREIRA, F.M.S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; DE CARNAVLHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comum Science**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 74-99. 2010.
- MORRIS, C.E.; MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 429-453, 2003.
- MOUTIA, J.F.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, L. Plant Growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, The Hague, n. 337, p. 233-242. 2010.
- MULDER, E.G.; LIE, T.A.; WOLDENDORP, J.W. Biology and soil fertility. In: UNESCO. **Soil biology**. Belgica: Reviews of research, 1969. p. 163-208.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, n. 93, v. 7, p. 2764-2769, 1996.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, n. 403, p. 853-858. 2000.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, p. 603-612, 2001.

NASCIMENTO FILHO, F.L.; ATROCH, A.L. Guaranazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de Fruteiras**. Viçosa: Editora UFV, 2002. p. 291-307.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Board on Science and Technology for International Development). Quality-protein maize. **National Academy**, Washington, D.C. 1988. 100 p.

NAVEED, M.; KHALID, M.; JONES, D.L.; AHMAD, R.; ZAHIR, Z.A. Relative efficacy of *pseudomonas* spp., containing accdeaminase for improving growth and yield of maize (*zea mays* L.) in the presence of organic fertilizer. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 40, p. 1243-1251, 2008.

NEHL, D. B.; KNOX, O. G. G. Significance of Bacteria in the Rhizosphere In: MUKERJI, K.; MANOHARACHARY, C.; SINGH, J. **Soil Biology: Microbial Activity in the Rhizosphere**. Berlin: Springer, 2006. p. 89-119.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v. 270, p. 26723-26726, 1995.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. Cap. 1, p. 15-60.

NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A., K. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 276-289, 2007.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. (Ed.). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L., eds. **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 471-550.

NICOLINI, K.P. **Produção de fertilizantes de liberação lenta a partir da torta de mamona (*Ricinus comunis*) e de uréia intercalada em caulins**. 2009. 126 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of Azospirillum. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, P.M.; BOWEN, G.D. (Eds.), **Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria**. Adelaide: Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, 1994. p. 274-278.

OKON, Y. *Azospirillum* as potential inoculant for agriculture. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 3, p. 223-338, 1985.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Jaguariúna: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161)

OLIVEIRA, M.A.; ZUCARELI, C.; SPOLAOR, L.T.; DOMINGUES, A.R.; FERREIRA, A.S. Desempenho agrônômico do milho sob adubação mineral e inoculação das sementes com rizobactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, p. 1040-1046, 2012.

OWEN, A.; ZDOR, R. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvet leaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, p. 801-809, 2001.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, Washington, v. 9, p. 1-55, 1986.

PALANIAPPAN, P.; CHAUHAN, P.S.; SARAVANAN, V.S.; ANANDHAM, R.; SA, T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Leptodezma* sp. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 46, n. 8, p. 807-816, 2010.

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

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3795-3801, 2002.

PARK, K.H.; LEE, O.M.; JUNG, H.I.; JEONG, J.H.; JEON, Y.D.; HWANG, D.Y.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied and Microbiology Biotechnology**, New York, n. 86, p. 947-955. 2010.

PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho** (*Zea mays* L.). 2009. 87 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

PELZER, G.Q. **Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias**. 2010. 78 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.

- PEREIRA, P.; ALBANEZ, F.; ROSENBLUETH, M.; ETCHEVERRY, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **International Scholarly Research Network, Ecology**, Durham, 2011, 10 p.
- PERES, J.R.R.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. Sobrevivência de estirpes de *Rhizobium japonicum* na superfície de sementes de soja inoculadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 489- 493, 1986.
- PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize an sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103 - 3110, 2006.
- PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production on the soil redox status. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 373–379, 2003.
- PINOTTI, E.B.; GODOY, L.J.G.; MANJI, M. Efeito de fontes e doses de fertilizantes fosfatados na cultura do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: IAC. 2012. Resumo 52.
- POLTRONIERI, M.C.; DUARTE, M.L.R.; RODRIGUES, J.E.L.F.; de NAZARÉ, R.F.R.; KATO, A.K.; de OLIVEIRA, A.F.F. **A cultura do guaraná**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 48 p. (Coleção plantar).
- PREFEITURA DE MAUÉS. **Dados Geográficos**. Disponível em <<http://www.maues.am.gov.br/geografia.php>>. Acesso em: 19 set. 2012.
- PROBANZA, A.; LUCAS, J.A.; ACERO, N.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth: Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. **Plant and Soil**, The Hague, n. 182, p. 59–66. 1996.
- PUGGINA, W.A. Mineral Fertilizer Use and the Environment. In: ISHERWOOD, K.E. **O uso de fertilizantes minerais e o meio ambiente**. Paris: International Fertilizer Industry Association (Ed.), February, 2000. 64 p.
- QUADTHALLMANN, A.; KLOPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.
- QUADTHALLMANN, A.; BEHAMOU, N.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 6, p. 577-582, 1997.
- QUADTHALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, n.3, p. 254-259, 1997.

QUECINE, M.C.ARAÚJO, W.L.; ROSSETO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 21, v.78. Nov. 2012.

RAIJ, B.van. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S., Eds. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 106-114.

RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. In Natural Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 881-887, 1997.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 1-11, 2001.

RAMOS, S.J.; FAQUIN, V.; RODRIGUES, C.R.; SILVA, C.A.; BOLDRIN, P.F. Biomass production and phosphorus use of forage grasses fertilized with two phosphorus sources. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, n. 33, p. 335-343, 2009.

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

RAPPEL, E.; LOIOLA, E. Estudos da Competitividade da Indústria Brasileira. In: COUTINHO, L.G. (Ed.). **Competitividade da Indústria de Fertilizantes**. Nota Técnica Setorial do Complexo Químico. Campinas: MCT, FINEP, PADCT. Estudo da Competitividade da Indústria Brasileira, Brasília, 1993. p. 79.

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

RAVEN, H.P.; EVERT, F.R.; EICHHORN, E.S. **Biologia vegetal**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. p. 698-719.

REICHARDT, K.; TIMM, L.C. Absorção de nutrientes pelas plantas. Solo, planta e atmosfera: conceitos, processos e aplicações. **Editores Manole**, São Paulo, p. 341-362. 2004.

REIGH, G.; O'CONNELL, M. Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium melilot*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, p. 94-102, 1993.

REIS, M.R.; SILVA, A.A.; GUIMARÃES, A.A.; COSTA, M.D.; MASSENSINI, A.M.; FERREIRA, E.A. Ação de herbicidas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 2, p. 333-341, 2008.

- REIS, V.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO- SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, n. 54, p. 2155–2162. 2004.
- RENGEL, Z.; ROSS, G.; HIRSCH, P. Plant genotype and micronutrient status influence colonization of wheat roots by soil bacteria. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 1, p. 99-113, 1998.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promoting. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319-339, 1999.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, n. 287, p. 15-21. 2006.
- ROESCH, L.F.; CAMARCO, F.O.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1201-1204, 2005.
- RITCHEY, K.D.; SILVA, J.E.; COSTA, U.F. Calcium deficiency in clayey B horizons of savanna oxisols. **Soil Science**, New York, v. 133, p. 378- 382, 1982.
- RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 278, p. 1-9, 2008.
- SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N; GARBOGGINI, F.F.; NOGUEIRA, N.L.; DA SILVEIRA, A.P.D. *Achromobacter insolitus* and *Zooglyphis ramigera* associated with wheat plants (*Triticum aestivum*). **Biology and fertility of Soils**, Berlin, n. 44, p. 1107-1112. 2008.
- SARAVANAKUMAR, D.; VIJAYAKUMAR, C.; KUMAR, N.; SAMIYAPPAN, R. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, p. 556-565, 2007.
- SAMBROOK, L.; FRITSCH; MANIATIS, T. Molecular cloning – A Laboratory manual. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1989. v. 1, 789 p.
- SANGOI, L.; ALMEIDA, M.L. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio para a cultura do milho num solo com alto teor de matéria orgânica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 13-24, 1994.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 282-285, 1995.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658-664, 2008.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mother: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHIMEL, Ecosystem consequences of microbial diversity and community structure. **Ecological Study**, New York, n. 113, p. 239-254. 1995.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. The last word: books as a statistical metaphor for microbial communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, n. 61, p. 23-34. 2007.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Disease suppressive soil root colonizing bacteria. **Science**, Washington, v. 216, p. 1376-1381, 1982.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. 2006. What are endophytes? In: _____. **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p. 1-13.

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

SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS (SBRT). **Fabricação de xarope de guaraná, extrato de guaraná e guaraná em pó**. Disponível em: <<http://www.sbirt.ibict.br>>. Acesso em: 14 jan. 2008.

SHAHAROONA, B.; NAVEED, M.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 79, p. 147-155, 2008.

SHER, F.M.; BAKER, R. Effect of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 12, p. 1567-73, Dec. 1982.

SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth promoting *Pseudomonas*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, p. 22-31, 1998.

SOTTERO, A.N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. 2003. 62 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo, Campinas, 2003.

SPERBER, J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Australian Journal of Agriculture Resource**, Sydney, v. 9, p. 778-781, 1958.

SMALLA K, WIELAND G, BUCHNER A, ZOCK A, PARZY J, KAISER S, ROSKOT, N, HEUER H; BERG G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4742- 4751, 2001.

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

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.

SZILAGYI-ZECCHIN, V.J. **Microrganismos endofíticos de milho (*Zea mays* L.): Investigação do potencial promotor de crescimento de bactérias radiculares e diversidade genética de fungos associados a folhas**. 2012. 110 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, T. A.; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, São Paulo, v. 3, p. 29-35, 2004.

SILVA, E.C.; BUZETTI, S.; GUIMARÃES, G.L.; LAZARINI, E.; SÁ, M.E. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto sobre Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 29, p. 353-362, 2005.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, p. 311-319. 2000.

_____. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SILVA, M. F.; REIS, V.M. Produção, caracterização e aplicação de anticorpo policlonal contra *Azospirillum amazonense*, estirpe Am15. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 01, p. 01-11, 2009.

SILVA-STENICO, M.E.; PACHECO, F.T.H.; CARRILHO, E.; RODRIGUES, J.L.M.; TSAI, S.M. Growth and Siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited condition. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, n. 4, p. 429-436, 2005.

SILVEIRA, A.B. **Isolamento e caracterização de linhagem de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul**. 2008, 113p. Tese (Doutorado em Ciência, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S. **Microbiota do solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007.

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

SRINATH, J.; BAGYARAJ, D.J.; SATYANARAYANA, B.N. Enhanced growth and nutrition of micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 19, p. 69-72, 2003.

STALEY, J.T. 1997. **The microbial World: Foundation of the Biosphere**. The American Academy of Microbiology. ASM, Washington, DC. Disponível em: <www.asmta.org/acasrc/acal.html>. Acesso em: Nov. 2008.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.

STURMAN, S.; BRAS, C.P.; SCHLAMMAN, H.R.M.; WIJFJES, A.H.M.; BLOEMBERG, G.; SPAINK, H.P. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 13, p. 1163-1169, 2000.

SUBBAIAH, C. C.; ZHANG, J.; SACHS, M. M. Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 369 - 376, May 1994.

SUMMER, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, New York, v. 12, p. 54-123, 1990.

SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS (SUFRAMA). **Projeto Potencialidades regionais Estudo de Viabilidade Econômica**. Guaraná. Julho 2003. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/publicações/proj_pot_regionais/guarana.pdf>. Acesso em: 21 Jul. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719 p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago (In Press), 2011.

THAKURIA, D.; TALUKDAR, N.C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R.C.; KHAN, M.R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, Calcutta, v. 86, p. 978-985, 2004.

THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; VANDEMEULEBROECKE, K.; SWINGS, J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 520-538, 2001.

TOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Current concepts in use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: STACEY, G.; KEEN, N. **Plant Microbe Interactions**, New York: Plant and Soil, 1995. v. 1, p. 187-235.

TOMBOLINI, R.; VAN DER GAAG, D.J.; GERHARDSON, B.; JANSSON, J.K. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3674-3680, 1999.

TRAN VAN, V.; BERGE, O.; KE, S.N.; BALANDREAU, J.; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnã. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, p. 273-284, 2000.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) – **World Agricultural Production**. Washington, DC: USDA – Agency Reports, 2012. Disponível em: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome?navid=AGENCY_REPORTS> . Acesso em: 07 mai. 2012.

Van der HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; Van STRAALLEN, N.M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, p. 296-310, 2008.

Van VLIET, A.H.M.; WOOLDRIDGE, K.G.; KETLEY, J.M. Iron-responsive gene regulation in a *Campylobacter jejuni* fur mutant. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 5291-5298, 1998.

VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C.E.; GINGIO, A.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 33, n. 5, p. 1227-1235, 2009.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 460-468, 2000.

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

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

VILLACIEROS, M; POWER, B; MARÍA S´ANCHEZ-CONTRERAS; LLORET, J.; ROKEI. ORUEZABAL; MARTAMART´YN ; FERNANDEZ-PIÑAS, F.; BONILLA, I; WHELAN, C.; DOWLING, D,N; RIVILLA, R.. Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 251, p. 47-54, 2003.

VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 1970. 164 p.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against red rot disease caused by *Colletotrichum falcatum* in sugarcane. **Proceedings of Sugar Technology Association of India**, Bombay, v. 61, p. 24-39, 2002a.

_____. Induction of systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 1-10, 2002b.

VORPAGEL, A.G. **Inoculação de *Azospirillum*, isolado e associado a bioestimulante em milho no noroeste do RS**. 2010. 56 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia)- Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí. 2010.

WAGNER, M.; HORN, M.; DAIMS, H.; Fluorescence *in situ* hybridization for the identification and characterization of procaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 6, n. 3, p. 302-309, 2003.

WAHYUDI, A.T.; ASTUTI, R.P.; WIDYAWATI, A.; MERYANDINI, B. Characterization of Bacillus sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, Cambridge, v. 3, n. 2, pp. 34-40, February 2011.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M., Cole J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p. 5261-7. 2007.

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.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. **Bactérias diazotróficas em abacaxizeiros e bananeiras: técnicas de inoculação e monitoramento**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1999. 16 p. (Embrapa-CNPAT. Documentos, 35).

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.

WELLER, D.M.; ZABLOTOWICZ, R. Recent results from field and greenhouse trials on biological control of diseases with obvious, visual and typical symptoms. In: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 1. Ed, 1987, Orillia. **Proceedings of the First International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria**. Orillia: Kloepper, J., 1987. p. 10-16.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

_____. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 86, p. 221-224, 1996.

WOODWARD, A.W; BARTEL, B. Auxin: Regulation, Action and Interaction. **Annals of Botany**. London, v. 95, p. 707-735, 2005.

WOESE, C.R.; FOX, G.E.; Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdom. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

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**, Campinas, v. 16, p. 423-432, 2003.

YASURIYAN, V.; HAMEED, M.S.; RAJ, S.A. Influence of adhesives and time lag between seed treatment and sowing on survival of rhizobia and crop response to inoculation. **Madras Agricultural Journal**, Coimbatore, n. 83, p. 488-490, 1996.

YOUNG, V. R.; PELLETT, P. L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, n. 59, p. 1203-1212. 1994.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional Diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

ZAK, D.R.; HOLMES, W.E.; WHITE, D.C.; PEACOCK, A.D.; TILMAN, D. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? **Ecology**, Durham, v. 84, n. 8, p. 2042-2050, 2003.

ZAKHAROVA, E.A.; SCHERBAKOV, A.A.; BRUDNIK, A.V.; SKRIPKO, N.G.; BULKHUN, N.S.; IGNATOY, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*. **European Journal Biochemistry**, Branisovska, v. 259, p. 572-576, 1999.

ZUCARELI, C.; CIL, I.R.; PRETE, C.E.C.; PRANDO, A.M. Eficiência agronômica da inoculação à base de *Pseudomonas fluorescens* na cultura do milho. **Revista Agrarian**. Dourados, v. 4, n. 13, p. 152-157, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rDNA de rizobactérias isoladas do guaranazeiro com as sequências contidas no banco de dados *GenBank* através da ferramenta *Blastn*

(Continua)

Cód. Linhagem	% Identidade	Nº Pb	Nº acesso melhor similaridade	E-value	Linhagem melhor similaridade no <i>Blastn</i>
RZ1MS1	96%	967	HQ696445.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>
RZ1MS2	96%	998	HQ696445.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>
RZ1MS3	97%	974	GU294296.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS4	97%	937	FJ796425.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS5	92%	973	JX233516.1	0.0	<i>Cupriavidus sp.</i>
RZ1MS6	97%	995	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS7	97%	985	GQ200831.1	0.0	<i>Pantoea dispersa</i>
RZ1MS8	96%	1008	HQ696445.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>
RZ1MS9	97%	981	EU721603.1	0.0	<i>Bacillus sp.</i>
RZ1MS10	95%	998	NR_044540.1	0.0	<i>Dyella terrae</i>
RZ1MS11	97%	1004	GU294296.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS12	97%	981	FJ598437.1	0.0	<i>Bacillus sp.</i>
RZ1MS13	98%	934	FM212275.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS15	97%	990	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS16	97%	969	EU721603.1	0.0	<i>Bacillus sp.</i>
RZ1MS17	96%	981	DQ374436.1	0.0	<i>Ralstonia sp.</i>
RZ1MS18	98%	990	HM032789.1	0.0	<i>Bacillus thuringiensis</i>
RZ1MS19	97%	1004	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS20	97%	980	EU721603.1	0.0	<i>Bacillus sp.</i>
RZ1MS21	97%	1007	FJ429168.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS22	94%	994	DQ381722.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ1MS23	95%	982	AY259129.1	0.0	<i>Corynebacterium sp.</i>
RZ2MS1	94%	984	JQ316420.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ2MS2	97%	985	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ2MS3	95%	978	NR_044540.1	0.0	<i>Dyella terrae</i>
RZ2MS4	97%	1005	JX025731.1	0.0	<i>Burkholderia anthina</i>
RZ2MS5	95%	981	FJ174612.1	0.0	<i>Bacillus anthracis</i>
RZ2MS6	97%	990	HQ696445.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>
RZ2MS7	98%	997	GU294296.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ2MS8	97%	828	JX480629.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ2MS9	96%	963	EU721603.1	0.0	<i>Bacillus sp.</i>
RZ2MS10	96%	955	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ2MS11	96%	971	HQ222324.1	0.0	<i>Dyella marenensis</i>
RZ2MS12	98%	951	HQ696445.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>
RZ2MS13	93%	979	FJ174596.1	0.0	<i>Bacillus thuringiensis</i>
RZ2MS14	97%	1009	HQ696445.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>
RZ2MS16	97%	988	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ2MS17	97%	944	FJ598437.1	0.0	<i>Bacillus sp.</i>
RZ2MS18	96%	975	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ2MS19	96%	998	HQ696445.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>

ANEXO A – Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rDNA de rizobactérias isoladas do guaranazeiro com as sequências contidas no banco de dados *GenBank* através da ferramenta *Blastn*

(Continuação)

Cód. Linhagem	% Identidade	Nº Pb	Nº acesso melhor similaridade	E-value	Linhagem melhor similaridade no Blastn
RZ2MS20	97%	1001	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ2MS21	97%	1009	HQ267096.1	0.0	<i>Ralstonia pickettii</i>
RZ2MS22	78%	988	JN835566.1	9,00E-115	<i>Bacillus cereus</i>
RZ2MS23	82%	931	FJ598437.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ3MS1	97%	984	HQ241936.1	0.0	<i>Lysobacter</i> sp.
RZ3MS2	96%	1004	FN666537.1	0.0	<i>Paenibacillus</i> sp.
RZ3MS3	96%	991	FJ654468.1	0.0	<i>Curtobacterium</i> sp.
RZ3MS5	97%	961	DQ140186.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ3MS6	97%	975	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ3MS7	94%	792	DQ677022.1	0.0	<i>Ralstonia</i> sp.
RZ3MS8	97%	986	GU294296.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ3MS9	97%	939	FM212275.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ3MS10	97%	921	JQ660597.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ3MS12	96%	964	EF114429.1	0.0	<i>Cupriavidus gilardii</i>
RZ3MS13	94%	997	JX293122.1	0.0	<i>Chryseobacterium</i> sp.
RZ3MS14	96%	962	FJ598437.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ3MS15	97%	948	FJ598437.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ3MS16	93%	949	AB245398.1	0.0	<i>Actinomycetales bacterium</i>
RZ3MS17	95%	999	JF327645.1	0.0	<i>Chryseobacterium</i> sp.
RZ3MS18	96%	973	AM232811.1	0.0	<i>Chryseobacterium</i> sp.
RZ3MS19	97%	946	FM212275.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ3MS20	97%	929	FJ598437.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ3MS21	96%	976	EU721603.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ3MS22	97%	983	GU294296.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ3MS23	97%	1005	GQ221777.1	0.0	<i>Enterobacter</i> sp.
RZ3MS24	97%	976	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ3MS25	97%	976	FJ598437.1	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
RZ3MS26	96%	967	GU294296.1	0.0	<i>Burkholderia</i> sp.
RZ3MS27	99%	987	HM032789.1	0.0	<i>Bacillus thuringiensis</i>
RZ3MS28	91%	1006	NR_044540.1	0.0	<i>Dyella terrae</i>
RZ3MS29	82%	1012	JQ811111.1	2,00E-27	<i>Bacillus safensis</i>
RZ4MS1	95%	1010	EU161996.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ4MS2	93%	999	JF915332.1	0.0	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>
RZ4MS4	97%	977	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ4MS5	94%	1004	JF915332.1	0.0	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>
RZ4MS6	98%	1001	HQ327476.1	0.0	<i>Delftia acidovorans</i>
RZ4MS7	89%	966	HM365932.1	0.0	<i>Chryseobacterium</i> sp.
RZ4MS8	95%	979	AY773192.1	0.0	<i>Burkholderia nodosa</i>

ANEXO A – Caracterização por similaridade obtida a partir da comparação das sequências parciais do gene 16S rDNA de rizobactérias isoladas do guaranazeiro com as sequências contidas no banco de dados *GenBank* através da ferramenta *Blastn*

(Conclusão)

Cód. Linhagem	% Identidade	N° Pb	N° acesso melhor similaridade	E-value	Linhagem melhor similaridade no Blastn
RZ4MS9	96%	987	EF204453.1	0.0	<i>Chryseobacterium sp.</i>
RZ4MS10	95%	967	HQ222324.1	0.0	<i>Dyella marensis</i>
RZ4MS11	97%	974	JQ316402.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ4MS12	93%	972	HQ327476.1	0.0	<i>Delftia acidovorans</i>
RZ4MS13	97%	1009	JQ897945.1	0.0	<i>Dyella marensis</i>
RZ4MS14	89%	833	JX010989.1	0.0	<i>Burkholderia stabilis</i>
RZ4MS15	97%	986	FJ796425.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ4MS16	97%	996	JX081589.1	0.0	<i>Dyella japonica</i>
RZ4MS17	96%	989	DQ381722.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ4MS18	96%	987	HQ327476.1	0.0	<i>Delftia acidovorans</i>
RZ4MS19	94%	966	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ5MS1	96%	980	AB488694.1	0.0	<i>Burkholderia oxyphila</i>
RZ5MS2	97%	987	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ5MS3	97%	996	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ5MS4	96%	1007	JN975200.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ5MS5	97%	1001	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ5MS6	87%	990	JQ660730.1	0.0	<i>Chryseobacterium sp.</i>
RZ5MS7	96%	1002	FJ547385.1	0.0	<i>Streptomyces sp.</i>
RZ5MS8	96%	1012	AB696776.1	0.0	<i>Burkholderia sp.</i>
RZ5MS9	97%	980	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ5MS10	97%	970	EU721603.1	0.0	<i>Bacillus sp.</i>
RZ5MS11	94%	985	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>
RZ5MS13	96%	980	JX025736.1	0.0	<i>Bacillus cereus</i>

ANEXO B – Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de rizobactérias do presente estudo e seus respectivos resultados

(Continua)					
Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no Blastn	AIA ^a µg/mL	FBN ^b	ISF ^c	IPS ^d
RZ1MS1	<i>Ralstonia pickettii</i>	000,00	-	1,7	0,0
RZ1MS2	<i>Ralstonia pickettii</i>	007,08	-	1,7	0,0
RZ1MS3	<i>Burkholderia</i> sp.	042,45	-	2,5	3,0
RZ1MS4	<i>Burkholderia</i> sp.	066,97	-	2,5	1,6
RZ1MS5	<i>Cupriavidus</i> sp.	007,51	-	1,6	0,0
RZ1MS6	<i>Burkholderia</i> sp.	056,43	+	2,2	2,9
RZ1MS7	<i>Pantoea dispersa</i>	084,17	-	2,5	0,0
RZ1MS8	<i>Ralstonia pickettii</i>	022,24	-	1,7	0,0
RZ1MS9	<i>Bacillus</i> sp.	129,87	+	2,0	0,0
RZ1MS10	<i>Dyella terrae</i>	000,00	-	0,0	0,0
RZ1MS11	<i>Burkholderia</i> sp.	132,56	+	2,5	1,5
RZ1MS12	<i>Bacillus</i> sp.	009,66	-	0,0	0,0
RZ1MS13	<i>Burkholderia</i> sp.	033,74	-	2,6	0,0
RZ1MS15	<i>Burkholderia</i> sp.	041,81	-	2,3	3,0
RZ1MS16	<i>Bacillus</i> sp.	006,48	-	2,1	0,0
RZ1MS17	<i>Ralstonia</i> sp.	024,49	+	0,0	0,0
RZ1MS18	<i>Bacillus thuringiensis</i>	007,61	-	0,0	0,0
RZ1MS19	<i>Burkholderia</i> sp.	043,42	-	0,0	3,1
RZ1MS20	<i>Bacillus</i> sp.	014,17	+	0,0	0,0
RZ1MS21	<i>Burkholderia</i> sp.	042,88	-	2,0	1,7
RZ1MS22	<i>Burkholderia</i> sp.	039,23	-	1,5	0,0
RZ1MS23	<i>Corynebacterium</i> sp.	024,39	-	0,0	0,0
RZ2MS1	<i>Burkholderia</i> sp.	004,82	-	0,0	0,0
RZ2MS2	<i>Burkholderia</i> sp.	019,66	-	2,4	1,7
RZ2MS3	<i>Dyella terrae</i>	003,85	-	0,0	0,0
RZ2MS4	<i>Burkholderia anthina</i>	028,37	+	3,3	1,5
RZ2MS5	<i>Bacillus anthracis</i>	000,00	-	0,0	0,0
RZ2MS6	<i>Ralstonia pickettii</i>	002,77	-	1,6	0,0
RZ2MS7	<i>Burkholderia</i> sp.	038,90	+	2,0	2,4
RZ2MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	032,94	+	2,6	1,7
RZ2MS9	<i>Bacillus</i> sp.	067,40	+	2,6	3,4
RZ2MS10	<i>Bacillus cereus</i>	002,77	-	0,0	0,0
RZ2MS11	<i>Dyella marenensis</i>	011,38	-	0,0	0,0
RZ2MS12	<i>Ralstonia pickettii</i>	020,84	-	0,0	0,0
RZ2MS13	<i>Bacillus thuringiensis</i>	010,09	-	0,0	0,0
RZ2MS14	<i>Ralstonia pickettii</i>	020,73	-	1,5	0,0
RZ2MS16	<i>Burkholderia</i> sp.	175,03	+	0,0	2,7
RZ2MS17	<i>Bacillus</i> sp.	011,59	-	0,0	0,0
RZ2MS18	<i>Bacillus cereus</i>	016,43	-	0,0	0,0
RZ2MS19	<i>Ralstonia pickettii</i>	021,38	-	1,5	0,0
RZ2MS20	<i>Burkholderia</i> sp.	049,87	+	2,1	2,6

ANEXO B – Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de rizobactérias do presente estudo e seus respectivos resultados

(Continuação)					
Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no Blastn	AIA ^a µg/mL	FBN ^b	ISF ^c	IPS ^d
RZ2MS21	<i>Ralstonia pickettii</i>	018,15	-	1,5	0,0
RZ2MS22	<i>Bacillus cereus</i>	005,84	-	0,0	0,0
RZ2MS23	<i>Bacillus</i> sp.	009,23	-	0,0	0,0
RZ3MS1	<i>Lysobacter</i> sp.	000,00	-	0,0	0,0
RZ3MS2	<i>Paenibacillus</i> sp.	032,02	-	0,0	0,0
RZ3MS3	<i>Curtobacterium</i> sp.	008,80	-	0,0	0,0
RZ3MS5	<i>Bacillus</i> sp.	012,94	-	0,0	0,0
RZ3MS6	<i>Bacillus cereus</i>	010,09	-	0,0	0,0
RZ3MS7	<i>Ralstonia</i> sp.	003,53	-	0,0	0,0
RZ3MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	026,54	+	3,8	1,6
RZ3MS9	<i>Burkholderia</i> sp.	045,25	+	3,3	1,4
RZ3MS10	<i>Bacillus cereus</i>	020,52	-	0,0	0,0
RZ3MS12	<i>Cupriavidus gilardii</i>	000,00	-	0,0	0,0
RZ3MS13	<i>Chryseobacterium</i> sp.	044,28	-	0,0	0,0
RZ3MS14	<i>Bacillus</i> sp.	006,97	-	0,0	0,0
RZ3MS15	<i>Bacillus</i> sp.	000,00	-	0,0	0,0
RZ3MS16	<i>Actinomycetales bacterium</i>	008,04	-	0,0	0,0
RZ3MS17	<i>Chryseobacterium</i> sp.	035,25	-	0,0	0,0
RZ3MS18	<i>Chryseobacterium</i> sp.	061,05	-	0,0	0,0
RZ3MS19	<i>Burkholderia</i> sp.	049,12	-	3,8	1,5
RZ3MS20	<i>Bacillus</i> sp.	009,55	-	0,0	0,0
RZ3MS21	<i>Bacillus</i> sp.	000,00	-	0,0	0,0
RZ3MS22	<i>Burkholderia</i> sp.	047,61	+	2,7	0,0
RZ3MS23	<i>Enterobacter</i> sp.	185,03	-	1,5	0,0
RZ3MS24	<i>Burkholderia</i> sp.	233,10	+	2,5	3,1
RZ3MS25	<i>Bacillus</i> sp.	015,35	+	2,8	0,0
RZ3MS26	<i>Burkholderia</i> sp.	019,98	+	2,5	0,0
RZ3MS27	<i>Bacillus thuringiensis</i>	000,00	-	0,0	0,0
RZ3MS28	<i>Dyella terrae</i>	036,22	-	0,0	0,0
RZ3MS29	<i>Bacillus safensis</i>	003,31	-	2,2	0,0
RZ4MS1	<i>Bacillus cereus</i>	002,88	-	0,0	0,0
RZ4MS2	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	081,81	-	0,0	0,0
RZ4MS4	<i>Bacillus cereus</i>	004,60	-	0,0	0,0
RZ4MS5	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	076,65	-	0,0	0,0
RZ4MS6	<i>Delftia acidovorans</i>	040,73	+	2,6	1,5
RZ4MS7	<i>Chryseobacterium</i> sp.	022,45	-	0,0	0,0
RZ4MS8	<i>Burkholderia nodosa</i>	040,19	+	2,1	0,0
RZ4MS9	<i>Chryseobacterium</i> sp.	080,09	-	0,0	0,0
RZ4MS10	<i>Dyella marenensis</i>	000,00	-	0,0	0,0
RZ4MS11	<i>Burkholderia</i> sp.	042,24	+	3,1	0,0

ANEXO B – Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados de rizobactérias do presente estudo e seus respectivos resultados

Cód. Linhagem	Linhagem melhor similaridade no Blastn	AIA ^a µg/mL	FBN ^b	(Conclusão)	
				ISF ^c	IPS ^d
RZ4MS12	<i>Delftia acidovorans</i>	055,57	+	0,0	1,6
RZ4MS13	<i>Dyella marenensis</i>	063,74	+	0,0	1,4
RZ4MS14	<i>Burkholderia stabilis</i>	014,60	+	3,2	2,0
RZ4MS15	<i>Burkholderia</i> sp.	038,69	+	1,4	1,5
RZ4MS16	<i>Dyella japônica</i>	009,33	-	0,0	0,0
RZ4MS17	<i>Burkholderia</i> sp.	020,84	-	1,6	0,0
RZ4MS18	<i>Delftia acidovorans</i>	495,25	-	0,0	0,0
RZ4MS19	<i>Bacillus cereus</i>	027,51	-	0,0	0,0
RZ5MS1	<i>Burkholderia oxyphila</i>	010,19	-	1,9	0,0
RZ5MS2	<i>Bacillus cereus</i>	008,74	-	0,0	0,0
RZ5MS3	<i>Bacillus cereus</i>	010,41	-	0,0	0,0
RZ5MS4	<i>Burkholderia</i> sp.	027,77	-	0,0	0,0
RZ5MS5	<i>Burkholderia</i> sp.	029,87	-	3,5	0,0
RZ5MS6	<i>Chryseobacterium</i> sp.	000,00	-	0,0	0,0
RZ5MS7	<i>Streptomyces</i> sp.	000,00	-	0,0	0,0
RZ5MS8	<i>Burkholderia</i> sp.	051,00	-	2,8	1,5
RZ5MS9	<i>Bacillus cereus</i>	029,23	-	0,0	0,0
RZ5MS10	<i>Bacillus</i> sp.	016,48	-	0,0	0,0
RZ5MS11	<i>Bacillus cereus</i>	016,97	-	0,0	0,0
RZ5MS13	<i>Bacillus cereus</i>	004,06	-	0,0	0,0

^a Concentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

^b Fixação Biológica de Nitrogênio;

^c Índice de Solubilização de Fosfato

^d Índice de Produção de Sideróforos