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

**Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16
(*Burkholderia ambifaria*) promotora de crescimento e bioinoculantes
comerciais aplicados nas culturas de soja e milho**

Bruno Augusto Prohmann Tschoeke

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

Bruno Augusto Prohmann Tschoeke
Engenheiro Agrônomo

Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e milho

Orientadora:
Profa. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE VERDI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

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

Tschoeke, Bruno Augusto Prohmann

Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*)
promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e
milho / Bruno Augusto Prohmann Tschoeke. - - Piracicaba, 2016.
92 p. : il.

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

1. Soja 2. *Burkholderia* 3. Milho 4. Promoção de crescimento vegetal 5. Interação
bactéria/planta 6. Transformação 7. Marcação com genes de fluorescência I. Título

CDD 633.34
T879m

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

Aos meus amados pais, Almir José Tschoeke e Maria Goretti Prohmann, grandes responsáveis pela minha formação, que sempre estiveram comigo e me incentivaram a acreditar em meu potencial em todos os momentos nesta árdua caminhada

Dedico

Aos meus queridos irmãos, Lucas Felipe e Isabelle Cristine, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos da minha vida

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ser tão maravilhoso comigo em todos os sentidos.

Aos meus pais, Almir José Tschoeke e Maria Goretti Prohmann, meus grandes exemplos de vida.

Aos meus irmãos, Lucas Felipe e Isabelle Cristine, pelo apoio e companheirismo sempre.

À minha querida orientadora Profa. Maria Carolina Quecine Verdi pelo apoio e disponibilidade sempre, um grande exemplo de profissional e pessoa.

À minha família em geral por sempre acreditar em mim.

Ao Prof. João Lúcio de Azevedo pelas sábias palavras e incentivo sempre.

Aos meus colegas de laboratório Andrea, Bia, Bruna, Carol Silva, Fábio, Giulia, Giulio, Gustavo, Isa, Jack, Jéssica, Joelma, Luca, Mari, Mateus, Nathalia, Paula, Patrícia, Rafael, Renata, Renatinha, Sarina, Tayara, Tiago e Zezo pelo apoio nos experimentos, companheirismo, conselhos e amizade sempre.

Aos meus amigos de sempre Adijaílton, Arthur, Diogo, Pedro Andrade e Timóteo pela força, amizade e distração de sempre.

À Esalq-USP por contribuir fortemente por mais essa etapa da minha formação profissional.

Ao DVATCOM, e às assistentes sociais Eliana, Áurea e Solange pelo apoio e auxílio com moradia na Vila da Pós-Graduação da Esalq.

À assistência social da Esalq pela disponibilidade e apoio.

À todos meus colegas moradores da Vila da Pós Graduação da Esalq pelo companheirismo e amizade.

Aos professores que contribuíram para melhorar minha formação em mais uma etapa da minha vida.

Ao Programa e coordenação da Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pelo suporte e atenção em todos os momentos.

À Capes pelo apoio financeiro, indispensável para a minha manutenção durante esta etapa.

E à todos que de maneira direta ou indireta contribuíram com meu trabalho.

*Ninguém é tão pequeno,
Que não tenha nada para dar.
E nem tão poderoso,
Que não tenha nada a receber.
Ninguém é tão fraco,
Que nunca tenha vencido.
Ninguém é tão forte,
Que nunca tenha chorado.
Ninguém é tao auto suficiente,
Para nunca ser ajudado.
Ninguém é tão inválido,
Que nunca tenha contribuído
Ninguém é tão sábio,
Que nunca tenha errado.
Ninguém é tão corajoso,
Que nunca teve medo.
Ninguém é tão medroso,
Que nunca teve coragem.
Ninguém é tão alguém,
Que nunca precisou de ninguém*

Autor desconhecido

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
2.1 Soja e milho: interação com bactérias promotoras de crescimento vegetal	27
2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP)	29
2.2.1 <i>Burkholderia</i> spp. como promotora de crescimento vegetal.....	31
2.3 Proteínas fluorescentes para monitoramento de bactérias	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Linhagens e condições de cultivo	35
3.2 Plasmídeos utilizados.....	35
3.3 Marcação para monitoramento da colonização das culturas pelas linhagens	36
3.3.1 Curva de crescimento bacteriano	37
3.3.2 Antibiógrama.....	37
3.3.3 Teste de antibiose entre as linhagens.....	38
3.3.4 Obtenção de células competentes	39
3.4 Teste de estabilidade de expressão das fluorescências	39
3.5 <i>Southern Blot</i>	40
3.5.1 Extração de DNA bacteriano	40
3.5.2 Restrição do DNA genômico e transferência para membrana de náilon.....	40
3.5.3 Preparo da sonda de hibridação molecular.....	41
3.6 Atividade sinérgica da RPCPs e bioinoculantes na promoção de crescimento vegetal	41
3.6.1 Eficiência das RPCPs e rizóbios quanto à promoção de crescimento em soja	42
3.6.1.1 Parâmetros avaliados quanto à promoção de crescimento da soja	43
3.6.2 Eficiência das RPCPs e Ab-v5 quanto à promoção de crescimento em milho	43
3.6.2.1 Parâmetros avaliados quanto à promoção de crescimento do milho	44
3.7 Monitoramento da colonização de milho e soja pela linhagem RZ2MS16:pNKGFP em consórcio com bioinoculantes comerciais	45
3.7.1 Bacterização das sementes	45
3.7.2 Análise por Microscopia Óptica de Fluorescência (MOF)	46

3.8 Análise estatística	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Curva de crescimento bacteriano	47
4.2 Antibiograma.....	49
4.3 Teste de antibiose.....	49
4.4 Análise molecular dos transformantes da linhagem RZ2MS16	51
4.5 Análise do efeito da transformação com o plasmídeo pNKGFP no crescimento da linhagem RZ2MS16.....	53
4.6 Análise do efeito da transformação com o plasmídeo pWM1013 no crescimento da linhagem SEMIA5080	53
4.7 Análise do efeito da transformação com o plasmídeo pWM1013 no crescimento da linhagem Ab-v5	54
4.8 Teste de estabilidade da expressão das fluorescências	55
4.9 Atividade sinérgica de RBPC e bioinoculantes na promoção de crescimento vegetal	57
4.9.1 Eficiência da RPCP e rizóbios quanto à promoção de crescimento em soja	57
4.9.2 Eficiência de RPCP e <i>Azospirillum</i> sp. quanto à promoção de crescimento em milho..	62
4.10 Colonização das plantas pelas linhagens bacterianas modificadas.....	65
4.10.1 Colonização em plantas de soja pela RZ2MS16:pNKGFP e SEMIA5080:pWM1013	65
4.10.2 Colonização em plantas de milho pela RZ2MS16:pNKGFP e Ab-v5:pWM1013.....	68
5 DISCUSSÃO	73
REFERÊNCIAS	81

RESUMO

Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e milho

As culturas da soja e milho são de grande importância econômica mundial e também para o Brasil, onde a área cultivada com essas duas culturas está estimada em 45.855.900 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores conforme suas características. A estimativa da safra mundial de soja em 2015/16 apresentou uma redução na produção global da oleaginosa para 319,0 milhões de ton, volume 1,1 milhão de ton inferior ao levantamento de dezembro de 2015. Ainda assim, trata-se de um volume recorde. Para o milho, a produção global foi de 967,9 milhões de ton, com uma redução no volume de 5,9 milhões de ton em relação ao levantamento realizado em dezembro de 2015. Nessas duas culturas são comumente utilizadas bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), reduzindo ou até mesmo, eliminando a aplicação de adubos nitrogenados. Estudos apontam que a simbiose entre BFN e as culturas soja e milho pode ser otimizada mediante a coinoculação com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Apesar de promissora, o estudo da utilização de BFN em associação com RPCPs é incipiente no Brasil. Assim, o presente trabalho teve como objetivo monitorar, a partir da marcação bacteriana, a interação entre a linhagem de *Burkholderia ambifaria* (RZ2MS16), uma rizobactéria proveniente do guaranazeiro e previamente descrita como promotora de crescimento em soja e milho e linhagens das espécies *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA5079), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA5080) e *Azospirillum brasilense* (Ab-v5 e Ab-v6) que são comercialmente utilizadas como bioinoculantes nessas culturas respectivamente. Os efeitos sinérgicos da interação entre RZ2MS16 e bioinoculantes comerciais foram avaliados em experimento de casa de vegetação. Também foi avaliado o efeito da coinoculação de bioinoculantes com outra rizobactéria proveniente do guaranazeiro, *Bacillus sp.* (RZ2MS9). As linhagens foram inoculadas separadamente e coinoculadas, sendo melhores resultados observados com a coinoculação das linhagens. As linhagens marcadas com genes de fluorescência selecionadas para estudo de interação foram RZ2MS16, Ab-v5 e SEMIA5080, sendo essa interação observada por microscopia de fluorescência, com também pelo reisolamento das linhagens marcadas. As linhagens RZ2MS16:pNKGFP e Ab-v5: pWM1013 e SEMIA5080:pWM1013 colonizaram todos os nichos avaliados em milho e soja, respectivamente, sendo também caracterizadas como endofíticas. Assim se observa que estudos desta natureza são de grande importância para um melhor entendimento da interação entre bactéria planta e o efeito da coinoculação no melhor desenvolvimento de plantas comercialmente utilizadas.

Palavras-chave: Soja; *Burkholderia*; Milho; Promoção de crescimento vegetal; Interação bactéria/planta; Transformação; Marcação com genes de fluorescência

ABSTRACT

Monitoring the interaction between rhizobacteria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) growth promoter and applied commercial bio-inoculants in soybean and corn

The soybean and corn are of great global economic importance and also to Brazil, where the area cultivated with these two crops is estimated at 45.8559 billion hectares, distributed in all producing states according to their characteristics. The estimate of the global soybean crop in 2015/16 showed a reduction in global production of oilseeds to 319.0 million tons, volume 1.1 million tons lower than the survey of December 2015. Still, it is a record volume. For corn, the total production was 967.9 million tons, with a reduction in volume of 5.9 million tons compared to the survey conducted in December 2015. In these two crops are nitrogen fixing bacteria commonly used (BFN), reducing or even eliminating the application of nitrogenous fertilizers. Studies show that the symbiosis between BFN and cultures soy and corn can be optimized by coinoculation with rhizobacteria promoting plant growth (PGPR). Although promising, the study of the use of BFN in association with RPCPs is incipient in Brazil. Thus, this study aimed to monitor, from the bacterial marking the interaction between the strain of *Burkholderia ambifaria* (RZ2MS16) a rhizobacteria from the guarana and previously described as a growth promoter in soybean and corn and strains of the species *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA5079), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA5080) and *Azospirillum brasilense* (Ab-v5 and v6-Ab) that are commercially used as inoculant these cultures respectively. The synergistic effects of the interaction between RZ2MS16 and commercial inoculant were evaluated in a greenhouse experiment. It was also evaluated the effect of coinoculation of inoculant with other rhizobacteria from the guarana, *Bacillus* sp. (RZ2MS9). The strains were inoculated separately and coinoculated, with best results seen with coinoculation lineages. The lines marked with fluorescence genes selected for study interactions were RZ2MS16, Ab-v5 and SEMIA5080, this interaction being observed by fluorescence microscopy with also by reisolation of the marked strains. Strains RZ2MS16: pNKGFP and Ab-v5: pWM1013 and SEMIA5080: pWM1013 colonizing all niches evaluated in corn and soybeans, respectively, also being characterized as endophytes. Thus it is observed that such studies are of great importance for a better understanding of the interaction between plant and bacteria coinoculation the effect of the improved development of plants used commercially.

Keywords: Soybean; *Burkholderia*; Corn; Plant growth promotion; Interaction bacteria/plant; Processing; Labeling with fluorescent genes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Teste de antibiose realizado com RZ2MS16 e Ab-v5. 1 - Meio controle, plaqueado e homogeneizado com o inóculo; 2 - Controle com antibiótico (canamicina), com formação de halo; 3 e 4 - Crescimento das bactérias, mostrando que não há antagonismo entre as linhagens analisadas.....38
- Figura 2 - Curva de crescimento da RZ2MS16 observada durante 26 horas de cultivo à 28°C em meio LB sob agitação constante (150 rpm) à 28°C. As leituras foram realizadas em triplicatas com o auxílio de um espectrofotômetro, medida a um comprimento de onda de 600nm. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....47
- Figura 3 - Curva de crescimento bacteriano, mensurando a densidade ótica sob medição do comprimento de onda (600nm) por tempo de cultivo. A e B – *Azospirillum* brasiliense (Ab-v5 e Ab-v6), C – *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA5079) e D – *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA5080). Meio LM para *Bradyrhizobium* spp. sob agitação constante de 150 rpm à 30°C. Meio DYGS para *A. brasiliense* sob agitação constante de 150 rpm à 35°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....48
- Figura 4 - Análise molecular dos transformantes da linhagem *B. ambifaria* (RZ2MS16) (A) Identificação dos transformantes por PCR utilizando os primers PPNKF (5'-CCTTCATTACAGAAACGGC-3') e PPNKRII (5'-GGTGATGCGTGATCTGATCC-3'). 1 – marcador molecular Ladder 1kb (0,2 μ g. μ L⁻¹); 2 – RZ2MS16; 3 – RZ2MS16:pNKGFP1; 4 - RZ2MS16:pNKGFP2; 5 - RZ2MS16:pNKGFP3; 6 - RZ2MS16:pNKGFP4; 7 – plasmídeo pNKGFP. (B) Southern Blot do plasmídeo pNKGFP e do DNA cromossomal de *B. ambifaria* digeridos por EcoRI e hibridizados com a sonda, fragmento de DNA obtida a partir dos primers PPNKF (5'-CCTTCATTACAGAAACGGC-3') e PPNKRII (5'-GGTGATGCGTGATCTGATCC-3'). 1 – RZ2MS16; 2 – RZ2MS16:pNKGFP1; 3 - RZ2MS16:pNKGFP2; 4 - RZ2MS16:pNKGFP3; 5 - RZ2MS16:pNKGFP4; 6 – plasmídeo pNKGFP.....51
- Figura 5 - Curva de crescimento da RZ2MS16 e mutantes observada durante 26 horas de cultivo em meio LB à 28°C sob agitação constante de 150 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, medidas com um comprimento de onda de 600nm. As análises foram realizadas em triplicatas. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....53

- Figura 6 - Curva de crescimento da SEMIA5080 e mutantes observada durante 30 horas de incubação em meio LM à 30°C sob agitação constante de 150 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm. As análises foram realizadas em triplicatas. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....54
- Figura 7 - Curva de crescimento da Ab-v5 e mutante observada durante 27 horas de incubação em meio DYGS à 35°C sob agitação constante de 150 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm. As análises foram realizadas em triplicatas. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....55
- Figura 8 - Teste de estabilidade realizado no mutante de Ab-v5 transformado com o plasmídeo pWM1013, observando o comportamento das gerações no decorrer do tempo. As análises foram realizadas em triplicatas em meio DYGS sob agitação constante de 150 rpm à 35°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....56
- Figura 9 - Teste de estabilidade realizado no mutante de RZ2MS16 transformado como plasmídeo pNKGFP, observando o comportamento das gerações no decorrer do tempo. As análises foram realizadas em triplicatas em meio LB com agitação constante de 150 rpm à 28°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....56
- Figura 10 - Teste de estabilidade realizado no mutante de SEMIA5080 transformado como plasmídeo pWM1013, observando o comportamento das gerações no decorrer do tempo. As análises foram realizadas em triplicatas em meio LM sob agitação constante de 150 rpm à 30°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão.....57
- Figura 11 - Médias das alturas, em centímetros, de 14 plantas de soja (APA), após 30 dias da germinação por tratamento: T1- RZ2MS16, T2- RZ2MS16 + SEMIA5079, T3- RZ2MS16 + SEMIA5080, T4- SEMIA5079, T5- SEMIA5080, T6- RZ2MS9, T7- RZ2MS9 + SEMIA5079, T8- RZ2MS9 + SEMIA5080, T9- Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....58
- Figura 12 - Médias do peso seco da parte aérea, em gramas, de 14 plantas de soja (PSPA), após 30 dias da germinação por tratamento: T1- RZ2MS16, T2- RZ2MS16 + SEMIA5079, T3- RZ2MS16 + SEMIA5080, T4- SEMIA5079, T5- SEMIA5080,

T6- RZ2MS9, T7- RZ2MS9 + SEMIA5079, T8- RZ2MS9 + SEMIA5080, T9- Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....59

Figura 13 - Médias do peso seco do sistema radicular, em gramas, de 14 plantas de soja (PSSR), após 30 dias da germinação por tratamento: T1- RZ2MS16, T2- RZ2MS16 + SEMIA5079, T3- RZ2MS16 + SEMIA5080, T4- SEMIA5079, T5- SEMIA5080, T6- RZ2MS9, T7- RZ2MS9 + SEMIA5079, T8- RZ2MS9 + SEMIA5080, T9- Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....60

Figura 14 - Médias do número de nódulos, em unidades, de 14 plantas de soja (NN), após 30 dias da germinação por tratamento: T1- RZ2MS16, T2- RZ2MS16 + SEMIA5079, T3- RZ2MS16 + SEMIA5080, T4 - SEMIA5079, T5- SEMIA5080, T6- RZ2MS9, T7- RZ2MS9 + SEMIA5079, T8- RZ2MS9 + SEMIA5080, T9- Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....61

Figura 15 - Médias do peso seco de nódulos, em gramas, de 14 plantas de soja (PSN), após 30 dias da germinação por tratamento: T1- RZ2MS16, T2- RZ2MS16 + SEMIA5079, T3- RZ2MS16 + SEMIA5080, T4 - SEMIA5079, T5- SEMIA5080, T6- RZ2MS9, T7- RZ2MS9 + SEMIA5079, T8- RZ2MS9 + SEMIA5080, T9- Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....62

Figura 16 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens SEMIA5080:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP durante a interação com soja 15 DAI. (A) SEMIA5080:pWM1013 em raiz de soja; (B) RZ2MS16 em raiz de soja (C) SEMIA5080:pWM1013 em folha de soja (D) RZ2MS16 em folha de soja. Barras com 100 μ m de comprimento. Aumento de 40X (A e B) e 100X (C e D).....65

Figura 17 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens SEMIA5080:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP durante a interação com soja 30 DAI. (A) SEMIA5080:pWM1013 em raiz de soja; (B) RZ2MS16 em raiz de soja (C) SEMIA5080:pWM1013 em folha de soja (D) RZ2MS16 em folha de soja. Barras com 100 μ m de comprimento. Aumento de 40X (A e B) e 100X (C e D).....66

- Figura 18 - Esquema da colonização por RZ2MS16:pNKGFP e SEMIA5080:pWM1013 em plantas desoja na parte aérea, raiz e rizosfera 15 e 30 DAI.....67
- Figura 19 - Reisolamento das linhagens da rizosfera, raiz e parte aérea das plantas de soja após 15 e 30 dias da inoculação em plantas de soja. A – SEMIA5080:pWM1013 e B - RZ2MS16:pNKGFP. Os dados da média de 4 repetições da densidade bacteriana foi transformado em $\log_{10}(\text{UFC}+2)$ g⁻¹ para normalização. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....68
- Figura 20 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens Ab-v5:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP durante a interação com milho 15 dias após a inoculação. (A) Ab-v5:pWM1013 em raiz de milho; (B) RZ2MS16 em raiz de milho (C) Ab-v5:pWM1013 em folha de milho (D) RZ2MS16 em folha de milho. Barras com 100 μm de comprimento. Aumento de 40X (A, B, C e D).....69
- Figura 21 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens Ab-v5:pWM1013, RZ2MS16:pNKGFP e consórcio durante a interação com milho 30 dias após a inoculação. (A) Ab- v5:pWM1013 em raiz de milho; (B) RZ2MS16 em raiz de milho (C) Consórcio das bactérias em raiz de milho (D) Ab-v5:pWM1013 em folha de milho (E) RZ2MS16 em folha de milho; (F) Consórcio das bactérias em folha de milho. Barras com 100 μm de comprimento. Aumento de 40X (A, B e C) e 100X (D, E e F).....70
- Figura 22 - Esquema da colonização por RZ2MS16:pNKGFP e Ab-v5:pWM1013 em plantas de milho na parte aérea, raiz e rizosfera 15 e 30 DAI.....71
- Figura 23 - Reisolamento das linhagens da rizosfera, raiz e parte aérea das plantas de soja após 15 e 30 dias da inoculação em plantas de milho. A – RZ2MS16:pNKGFP e B – Ab-v5:pWM1013. Os dados da média de 4 repetições da densidade bacteriana foi transformado em $\log_{10}(\text{UFC}+2)$ g⁻¹ para normalização. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plasmídeos utilizados para transformação.....	36
Tabela 2 - Antibiógrama das linhagens bacterianas.....	49
Tabela 3 - Teste de antibiose entre as linhagens RZ2MS16, Ab-v5 e Ab-v6. Realizado com todas as possibilidades de interação, em triplicatas.	50
Tabela 4 - Teste de antibiose entre as linhagens RZ2MS16, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Realizado com todas as possibilidades de interação, em triplicatas.	50
Tabela 5 - Eficiência da transformação das linhagens bacterianas	52
Tabela 6 - Parâmetros analisados em relação à promoção de crescimento em milho	64

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas agrícolas de produção assumiram historicamente a manutenção da produtividade ao longo do tempo como conceito de sustentabilidade. Atualmente este conceito evoluiu e surge como uma característica dinâmica a ser analisada e medida, envolvendo fatores físicos, bióticos, econômicos e sociais (GOMES; MELLO; MANGABEIRA, 2009).

Segundo Giordano (2005), as atividades agrícolas são reconhecidamente causadoras de problemas ao meio ambiente. Portanto, a sustentabilidade de ecossistemas está diretamente relacionada com o fluxo da energia no sistema ao longo do tempo, sendo esta energia renovável ou não (BROWN; ULGIATI, 1997).

O desafio que se apresenta para a atividade agrícola do futuro envolve a gestão bem sucedida dos recursos naturais para satisfazer as necessidades humanas, mantendo a qualidade ambiental e conservando riquezas naturais para as próximas gerações (SINGH; PANDEV; SINGH, 2011).

Devido à necessidade de minimizar os impactos causados ao meio ambiente, sobretudo com a prática agrícola, como erosão dos solos, poluição do solo, da água e dos alimentos, as empresas têm incorporado ações sustentáveis às suas estratégias, seja por pressão da opinião pública, ou pela busca da vantagem competitiva com a criação de ações inovadoras que diminuam os danos ao ambiente (ROMEIRO, 2007). A partir disto, os microrganismos se apresentam como potenciais biotecnológicos para a aplicação nas mais diversas áreas para a resolução ou para o auxílio na resolução de diversos problemas na área ambiental.

Estima-se que existam na Terra aproximadamente 300.000 espécies vegetais, sendo cada planta, individualmente, hospedeira de um ou mais microrganismos (STROBEL et al., 2004). Interagindo com as plantas podem ser encontrados microrganismos patogênicos causadores de doenças e/ou microrganismos benéficos, os chamados endófitos. A diferenciação entre endófito e patógeno não é definitiva, uma vez que a relação benéfica ou patogênica depende de fatores bióticos e abióticos, sendo ainda praticamente desconhecidos, os mecanismos moleculares que regem essas interações (KLOEPPER, 2003). Certamente, apesar de importantes, as interações benéficas entre microrganismos e planta são menos estudadas, havendo a necessidade de mais estudos nessa área.

Sem o auxílio de microrganismos, as plantas possuem grande dificuldade para se desenvolver normalmente. Há um grande número de bactérias que se desenvolvem no solo, e

estas, por muitas vezes, estão concentradas na rizosfera (região de poucos milímetros de espessura de solo em torno da raiz). Há estudos mostrando que aproximadamente 7 a 15% da superfície total das raízes é colonizada por células microbianas (GRAY; SMITH, 2005).

Dentre as bactérias que podem interagir benéficamente com as plantas destacam-se as Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP). Essas bactérias têm sido consideradas como essenciais em relação ao suprimento de nutrientes disponibilizados às plantas, como nitrogênio, fósforo e ferro, auxiliando num melhor desenvolvimento durante todo o ciclo do vegetal (CHANWAY, 1997). Além disso, elas podem contribuir com o aumento do comprimento das raízes e a densidade dos pelos radiculares. Tais benefícios estão diretamente relacionados à produção bacteriana de hormônios vegetais ou reguladores do crescimento vegetal, como: o ácido indol acético (AIA), giberelinas e citocininas (CATTELAN, 1999), controle biológico (PLEBAM et al., 1995; BOLAÑOS-JIMENEZ et al., 2001), indução de resistência sistêmica a patógenos e absorção de nutrientes a partir da solução do solo (HALLMANN et al., 1997).

Além de RPCP, as bactérias endofíticas têm sido descritas contribuindo no aumento da produtividade das plantas (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Essas bactérias podem ser classificadas como facultativas ou obrigatórias (HARDOIM; VAN OVERBEEK, VAN ELSAS, 2008). Segundo Rosenblueth e Martinez-Romero (2006) as bactérias endofíticas obrigatórias são organismos que vivem unicamente dentro das plantas sem possuir estágio de vida fora das mesmas, sendo transmitidas via planta-planta ou planta-inseto. Por serem difíceis de serem acessadas, essas bactérias endofíticas obrigatórias são pouco exploradas para aplicação na agricultura (HARDOIM; VAN OVERBEEK, VAN ELSAS, 2008). Já as bactérias endofíticas facultativas alternam o ciclo de vida entre planta e ambiente externo, como exemplo na rizosfera e, de acordo com as condições ambientais, entram e persistem no interior do hospedeiro.

Tanto como endófitas como rizosféricas, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia*, que tem se mostrado muito promissor em promover o crescimento e participar de maneira efetiva quanto à fitossanidade das mais diversas culturas. Essas bactérias já foram encontradas em alta densidade populacional, colonizando endofiticamente os tecidos das plantas de cana-de-açúcar (KUKLINSKY-SOBRAI, 2003; MENDES et al., 2007; KUSS et al., 2007), milho, trigo, arroz, ervilha, girassol, rabanete (BALDANI; BALDANI; DOBEREINER, 2000, CICCILLO et al., 2002; VAN et al., 2000; COENYE; VANDAMME, 2003, CHIARINI et al., 2006), feijão-caupi (ZHANG et al., 2007) e soja

(FERNANDEZ et al., 2007), sendo excelentes candidatas para formulação de novos bioinoculantes.

Além de *Burkholderia* spp., algumas bactérias já têm comprovado seu papel quanto a promoção de crescimento vegetal, sendo as mesmas comercializadas como bioinoculantes, destacando-se bactérias do grupo dos rizóbios, amplamente utilizados na cultura de soja (SOUCHIE et al., 2005), como exemplo às pertencentes aos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (NEVES; RUMJANEK, 1997; ZILLI et al., 2006; MOREIRA, 2008), e linhagens do gênero *Azospirillum* mundialmente utilizadas como inoculantes para promover crescimento vegetal de gramíneas como milho (HUNGRIA et al., 2010). Essas bactérias são utilizadas principalmente pela capacidade de fixar nitrogênio atmosférico disponibilizando-o prontamente à planta.

A utilização de apenas um organismo como bioinoculante em plantas já apresenta resultados eficientes, todavia estudos mostram que a coinoculação com mais de um organismo pode melhorar ainda mais o desenvolvimento vegetal, podendo assim suprir as necessidades atuais relacionadas à sustentabilidade agrícola (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Araújo et al. (2010) estudando os efeitos da coinoculação entre *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* sp. em *Vigna unguiculata* observaram que esta associação favoreceu o aumento da nodulação, conseqüentemente houve um incremento na fixação biológica de nitrogênio, revertendo num melhor desenvolvimento da leguminosa. Ferlini (2006) estudando a coinoculação entre *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* sp. observou que o efeito desta associação foi benéfico, e se deve em maior parte, à capacidade que a *A. brasilense* tem de produzir fitormônios, como por exemplo, o ácido indol acético. Isto determina um maior desenvolvimento do sistema radicular, e, portanto, a possibilidade de explorar um volume mais amplo de solo (FERLINI, 2006).

Assim, fica evidente que outros componentes além do nitrogênio são essenciais para o crescimento das plantas. Nesse contexto, as bactérias endofíticas e RPCPs têm sido apontadas como extremamente promissoras ao ecossistema de plantas em relação ao suprimento de elementos de crescimento como o nitrogênio, além de fósforo e ferro (CHANWAY, 1997), sendo amplamente difundido seu potencial como uma alternativa associadas à Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), resultando num cultivo com menor uso de insumos agrícolas (LAVIE; STOTZKY, 1986).

A soja e o milho estão entre as 20 principais culturas do Brasil. O primeiro levantamento, para a safra 2015/16, a produção de grãos está estimada em um volume entre 210,31 e 213,47 milhões de ton, variação entre 0,2 e 1,7%. Esse resultado representa um

aumento na produção entre 471,5 e 3.626,4 mil ton, sobre a safra colhida em 2014/15. O grão mais produzido no país é a soja, que detém de 56,2% da produção total nacional de grãos, seguido pelo milho com 26,4% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015). Além de serem culturas de suma importância para economia mundial e brasileira, a soja e milho já são estudadas quanto a sua associação com microrganismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico como também sob outras formas relacionadas à promoção de crescimento. No cenário mundial, os EUA seguem como o maior produtor global da oleaginosa, com 107,0 milhões de ton. Para o Brasil, não houve modificações em termos de produção, estimada em um recorde de 100 milhões de ton para o ciclo 2015/16 (UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2016). A produção dos EUA saiu de 346,8 milhões de ton em dezembro de 2015 para 345,5 milhões de ton no relatório atual. Com isso, o país deve colher volume 4,3% menor do que o observado em 2014/15. A área com o milho nos EUA foi ampliada, mas houve redução na produtividade da lavoura (USDA, 2016).

Para um bom desenvolvimento da cultura da soja, um importante componente químico é o nitrogênio. Este elemento pode ser assimilado pelas plantas de diversas formas: obtido diretamente do solo, por meio da decomposição da matéria orgânica, dos fertilizantes nitrogenados, da fixação química do N_2 em descargas elétricas e por meio da fixação biológica do N_2 . Este último é um processo que ocorre a partir da associação simbiótica entre estirpes específicas de bactérias e a própria planta, sendo este, pelo ponto de vista econômico e ecológico, considerado o mais importante. No Brasil, não é mais necessária a aplicação, segundo recomendações de adubação, de fertilizantes nitrogenados para a cultura da soja, pois a fixação biológica do N_2 é capaz de suprir as necessidades de nitrogênio da planta (HUNGRIA, 1999; VARGAS; HUNGRIA, 1997; CAMPOS; HUNGRIA; TEDESCO, 2001).

Já no milho, o nitrogênio é considerado um dos elementos que podem interferir de forma mais intensa na sua produtividade, sendo esse composto um os principais responsáveis pelo acréscimo da produtividade e na quantidade de proteína presente nos grãos (AMADO; MIELNICZUK; AITA, 2002), bem como possuindo uma participação direta na biossíntese de proteínas e clorofilas (ANDRADE et al., 2003). O efeito da bactéria do gênero *Azospirillum* spp. no desenvolvimento do milho, está estritamente relacionado ao aumento de produtividade nessa cultura devido à capacidade que esta bactéria possui em fixar nitrogênio (BÁRBARO; BRANCALIANO; TICELLI., 2008).

Desta forma, justifica-se o uso de milho e soja como modelos para estudo de interação entre BFN e RPCP's visando o melhoramento da promoção de crescimento em gramínea e leguminosa.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo monitorar a interação entre a linhagem de *B. ambifaria* (RZ2MS16), uma rizobactéria promotora de crescimento em soja e milho, com as linhagens pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum brasilense* comercialmente utilizadas como inoculantes, além da coinoculação com *Bacillus* sp. (RZ2MS9), visando o melhor entendimento entre bactérias coinoculadas em diferentes hospedeiros e da possível atividade sinérgica dessas bactérias quando associadas às culturas do milho, uma gramínea, e, soja, uma leguminosa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Soja e milho: interação com bactérias promotoras de crescimento vegetal

Estimativas realizadas para o ano de 2015 para a safra nacional de cereais, leguminosas e oleaginosas totalizou 210,4 milhões de ton, superior 8,8% à obtida em 2014 (193,3 milhões de ton). A área colhida em 2015 foi de 57,7 milhões de hectares, apresentando acréscimo de 2,0% frente à área colhida em 2014 (56,5 milhões de hectares). O milho e a soja são os principais produtos deste grupo, juntos somam 85,4% da produção brasileira de cereais, leguminosas e oleaginosas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2015).

A produção de soja estimada para o Brasil, em 2015 atingiu uma produção de aproximadamente 101,9 milhões de ton, aumento de 5,9% em relação a 2014 (CONAB, 2015). Os produtores investiram no plantio da leguminosa aproveitando-se do preço compensador praticado pelo mercado. Mato Grosso é o principal produtor de soja do país participando com 28,7% do total nacional, seguido por Paraná com 17,6% da produção nacional; São Paulo aparece com 2,3% (IBGE, 2015). Segundo o USDA (2016), os EUA seguem como o maior produtor global da oleaginosa, com 107,0 milhões de ton. Porém, o USDA reduziu a expectativa de colheita do país em 1,4 milhão de ton em relação ao relatório anterior.

A produção de milho em 2015 para o Brasil foi de 83,5 milhões de ton, queda de 2,2% em relação a 2014 (CONAB, 2015). Segundo estimativas sobre último levantamento de safra para o milho em grãos, apontam que Mato Grosso é o principal produtor de milho do país 21% do total nacional, seguido por Paraná com 19%. São Paulo participa com 5,4% da produção (IBGE, 2015).

Mundialmente, a produção dos EUA, maior produtor do grão no mundo, atingiu uma produção de 345,5 milhões de ton em 2015. Com isso, o país colheu um volume 4,3% menor do que o observado em 2014/15. Segundo o USDA (2016), a área com o milho nos EUA foi ampliada, mas houve redução na produtividade da lavoura. Outro destaque relevante foi a produção da África do Sul, que saiu de 12,0 para 8,0 milhões de ton.

O Brasil tem sido considerado um País modelo na aplicação dos benefícios provenientes da fixação biológica do nitrogênio, especialmente pela utilização de estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* com a cultura da soja, em simbioses capazes de suprir totalmente a demanda da planta pelo elemento. (HUNGRIA; CAMPO, MENDES, 2007).

Todos os microrganismos fixadores de nitrogênio são procariotos e possuem o complexo nitrogenase, que por ser uma enzima redutora pode sofrer inibição pelo oxigênio ou ser inativada quando já sintetizada, dessa forma alguns mecanismos de proteção atuam quando o processo de FBN está ativo. No caso da simbiose entre leguminosas e bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* este processo ocorre no interior dos nódulos, onde a nitrogenase é protegida contra o excesso de oxigênio pela leghemoglobina, que dá coloração rósea aos nódulos (VARGAS et al., 2004; REIS et al., 2006).

Apesar de promissores, vários estudos mostram que a interação destas culturas com diversas espécies de bactérias, causam melhorias significativas na produtividade das mesmas. A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um exemplo disto, já que têm possibilitado a redução dos custos de produção na cultura da soja com aumento da competitividade do produto no mercado internacional (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003). Estimativas apontam para contribuições da FBN da ordem de mais de 300 kg de nitrogênio ha⁻¹, além da liberação de 20-30 kg de nitrogênio ha⁻¹ para a cultura seguinte (HUNGRIA; CAMPO, MENDES, 2007).

Para a soja, no Brasil, a importância desse processo transformou a inoculação com bactérias nas sementes em uma necessidade tecnológica com ganhos econômicos pela supressão de fertilizantes nitrogenados, de aproximadamente 3 bilhões de dólares anuais, considerando a recomendação técnica de 240 kg de nitrogênio para produzir 3.000 kg ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2005).

Harper (1999) demonstrou que a necessidade de nitrogênio da cultura da soja é suprida sob ótimas condições de produção com a simbiose do rizóbio. No mesmo sentido, Silva et al. (2011) mostraram que o nitrogênio mineral aplicado no sulco de semeadura em dose maior que 20 kg ha⁻¹ pode inibir a nodulação e consequentemente comprometer a eficiência da FBN, acarretando respostas negativas na produtividade.

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de se conseguir identificar microrganismos que possuam a capacidade de manter relações de simbiose com gramíneas, assim como já ocorre na cultura da soja com a *B. japonicum*. Neste sentido, uma bactéria que ganha importância e é alvo de diversos estudos, é o *Azospirillum brasilense*, que apresenta um grande potencial de resposta em associação com a cultura do milho. Há um interesse na utilização dessa bactéria como promotora de crescimento vegetal, sua contribuição para auxiliar a nutrição de plantas tem aumentado, e tende a se intensificar daqui para os próximos anos. Este fator se deve ao alto valor financeiro investido anualmente com

fertilizantes, sem esquecer o que hoje está em evidência no mundo todo, o que se chama de Agricultura Sustentável (HUNGRIA et al., 2010).

Em milho, relacionado à contribuição da fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento de plantas, Mazzuchelli, Sossai e Araújo (2014) observaram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* em sementes de milho aumentou a produção do grão em 21,9% em relação ao controle. A interação positiva entre estas bactérias e o milho tem sido demonstrada por vários autores e, embora ainda não seja prática agrícola consolidada, levantamentos de diversos experimentos realizados em vários países mostram que a inoculação com *Azospirillum* resultou, na maioria dos casos, em aumento de matéria seca, de produção de grãos e de acúmulo de nitrogênio nas plantas inoculadas. Como exemplo, Libório et al. (2015) observaram efeito positivo na prática de inoculação das sementes com *A. brasilense* associada a redução da adubação nitrogenada recomendada em 50% para biomassa foliar, massa seca de plantas e rendimento de grãos dos híbridos de milho testados sem variação em relação aos genótipos utilizados

Culturas inoculadas com *Azospirillum* apresentaram influências sobre a morfologia do sistema radicular do vegetal, favorecendo o aumento do número de radículas, o diâmetro médio das raízes laterais e de adventícias. O que auxilia numa maior exploração do volume de solo, e aumenta a superfície de absorção das raízes da planta (OKON; VANDERLEYDEN, 1997; BERGAMASCHI, 2006; QUADROS, 2009).

A partir da utilização de bioinoculantes a base de *Azospirillum* spp., Hungria et al. (2010) observaram um incremento na produtividade de grãos de milho, a partir da bacterização de sementes. Já Cavallet et al. (2000) encontraram resultados onde se observou que, com a inoculação de *Azospirillum* sp. em milho, houve um aumento no comprimento médio das espigas e na superfície de absorção das raízes da planta. No entanto, não apresentou mudanças quanto à altura da planta e o número de fileiras de grãos por espiga.

2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP)

Estudos sobre a atividade microbiológica na rizosfera de diversos vegetais levaram ao descobrimento de diversos grupos de microrganismos importantes, capazes de atuar de maneira benéfica, promovendo o crescimento bom desenvolvimento de plantas. (WELLER; TOMASHOW, 1994), sendo denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas ou RPCP (BISWAS; LADHA; DAZZO, 2000; GYANESHWAR et al., 2001; GRAY;

SMITH, 2005; BARRIUSO et al., 2005; KOKALIS-BURELLE; KLOEPPER; REDDY, 2006; COOK, 2007; KRAVECHENCKO et al., 2002).

Grande parte das RPCPs estudadas são Gram negativas (ANTOUN et al., 1998). Essas bactérias podem exercer efeitos positivos sobre as plantas, promovendo o crescimento vegetal por influência direta, a partir do aumento na solubilização e disponibilização de fosfato mineral e outros nutrientes (FREITAS; BANERJE; GERMIDA, 1997; ASHGAR et al., 2002), produção de reguladores de crescimento vegetal, como: auxinas, várias giberelinas e citocininas (EL-KHAWAS; ADACHI, 1999); ou indireta com a produção de diversos antibióticos ou outros mecanismos de biocontrole, inibindo o crescimento de diversos microrganismos considerados fitopatogênicos (DASHI, 1998, ASHGAR et al., 2002; GRAY; SMITH, 2005). Além de favorecer seu estabelecimento quando na presença de um ambiente que apresente condições adversas, como salinidade e estresse hídrico (SOUCHIE et al., 2005).

A maioria das bactérias e fungos presentes na rizosfera apresenta dependência das associações com plantas, que são claramente reguladas pelos exsudatos radiculares (BAIS et al., 2004). Phillips et al. (2003) definiram estes exsudatos como sendo um dos principais meios de comunicação na rizosfera a ser utilizado pelos microrganismos que ali residem, de modo que os vegetais devem fazer uso de uma grande variedade de compostos e moléculas sinais para realizar esta comunicação. Lamb, Tonkyn e Kluepfel (1996) relataram que as populações bacterianas são maiores nas regiões das raízes e que diminuem no caule e nas folhas.

Os benefícios das RPCPs relacionadas à promoção de crescimento podem ser observados nas mais variadas espécies vegetais como alfafa (OLSEN; MISAGHI, 1981), beterraba (THRANE et al., 2000), rabanete (LEEMAN et al., 1995), sorgo (CHIARINI et al., 1998), batata (GASONI et al., 2001), milho (HUNGRIA et al., 2010) e soja (HUNGRIA et al., 2005).

Guimarães et al. (2013) estudando o efeito da inoculação de *Bacillus amyloliquefacies* sob a promoção de crescimento em alface, observaram que o efeito foi significativamente positivo sobre o diâmetro de parte aérea das plantas de alface, com aumento de 14,75%. Em relação ao peso médio da massa fresca verificou-se um incremento de 26,5%, comparado à testemunha. Dos Santos et al. (2014) observaram que a presença de *Bacillus* sp e *Enterobacter cloacae* aumentou a capacidade, de plantas de girassol sob estresse hídrico, realizarem o ajustamento osmótico, pelo maior acúmulo de solutos orgânicos compatíveis.

Entretanto, poucos estudos relatam a interação das mesmas com bactérias já utilizadas comercialmente como bioinoculantes agrícolas.

2.2.1 *Burkholderia* spp. como promotora de crescimento vegetal

O gênero *Burkholderia* é composto por bactérias Gram-negativas pertencentes ao Filo das Proteobactérias e Classe das Betaproteobactérias (HOLMES; GOVAN; GOLDSTEIN, 1998). Atualmente este gênero compreende mais de 98 espécies (LIST OF PROKARIOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE - LPSN, 2016), sendo encontrados nos mais variados nichos ecológicos, onde os mais comuns são o solo e a rizosfera (COENYE; VANDAMME, 2003).

Caracterizadas por possuir uma considerável versatilidade fisiológica (BALDANI et al., 1997), algumas espécies de *Burkholderia* têm demonstrado ser muito eficientes no controle biológico, na biorremediação, e na promoção de crescimento vegetal (O'SULLIVAN; MAHENTHIRALIGAM, 2005). Estudos sobre as bactérias deste gênero habitantes da rizosfera tem mostrado que algumas são capazes de fixar nitrogênio, crescer em uma ampla faixa de temperatura, produzir ácido indol acético, sideróforos, solubilizar fosfato inorgânico, degradar poluentes, produzir compostos antimicrobianos, e de ocupar uma diversidade de nichos ecológicos (BALDANI et al., 1997; BODDEY et al., 2003; SALLES, 2005). Além de apresentar atividade antagônica contra vários fungos fitopatogênicos como *Fusarium* e *Rhizoctonia* (BEVININO et al., 1998).

A linhagem RZ2MS16, segundo estudos realizados por Batista (2013) *in vitro*, se mostrou positiva para fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido indol acético ($175 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e produção de sideróforos. Em experimentos conduzidos em casa de vegetação, as plantas inoculadas em relação ao controle (sem inoculação) foi expressivo: incrementos na altura (16% em soja, 33% em milho, 14% em cana-de-açúcar), no peso seco da parte aérea (102% em soja, 115% em milho) e no peso seco do sistema radicular (137% em milho, 68% em cana-de-açúcar), aos 60 dias (milho e soja) e 90 dias (cana-de-açúcar) após a germinação.

Há vários estudos apontando que bactérias pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Herbaspirillum* são comumente isoladas da rizosfera e do interior de tecidos vegetais em diversas culturas no Brasil. Em relação à inoculação com *Burkholderia* em plantas de arroz, Baldani, Baldani e Dobereiner (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 nitrogênio absorvido em plantas de milho, demonstrando a importância de uso consorciado de bactérias promotoras de crescimento.

2.3 Proteínas fluorescentes para monitoramento de bactérias

A proteína verde fluorescente na forma selvagem *Green Fluorescent Protein* (GFP) extraída da *Aequorea victoria*, tem como característica a produção de uma luz verde brilhante fluorescente quando estimulada com a luz ultravioleta (UV) (WARD, 1998). O GFP é um cromóforo derivado da sequência de aminoácidos primários, através da ciclização do hexapéptido serinadehidrotirosina-glicina. A fluorescência se deve a três aminoácidos contínuos próximos ao aminoácido terminal da proteína (CODY et al., 1993).

Atualmente, além da GFP, são conhecidas várias opções de marcadores a partir de proteínas fluorescentes, que podem ser utilizadas para o monitoramento de microrganismos. Essas proteínas fluorescentes (geralmente *gfp* mutantes) possuem alterações das suas propriedades de excitação e emissão (TSIEN, 1998), sendo amplamente utilizadas em estudos de ecologia microbiana. As GFPs de colorações diferentes (chamadas de proteínas autofluorescentes - AFPs) permitem o uso de marcas múltiplas de fluorescência, podendo ser distinguidas facilmente umas das outras (YANG et al., 1998; ELLENBERG; LIPPINCOTT; PRESLEY, 1999). A grande vantagem observada é que quando o gene da GFP e AFP é colocado sob controle de um promotor, o momento e a duração da expressão do promotor podem ser estudados em tempo real no tecido vivo não necessitando da destruição das células nem adição de nenhum substrato exógeno (BLOEMBERG et al., 1997; GAGE; BOBO; LONG, 1996; CODY et al., 1993).

Como exemplo de sua aplicação, Wang et al. (2007) desenvolveram um plasmídeo vetor (pDSK-GFPuv) que expressa fortemente a proteína GFP com o objetivo de realizar o monitoramento do processo de infecção, localização de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em plantas de tabaco selvagem, analisando estas atividades por microscopia de fluorescência. Neste trabalho, os autores conseguiram acompanhar o processo infeccioso, observando uma importante correlação entre o número de células bacterianas e a intensidade da fluorescência, obtendo desta forma, uma estimativa rápida referente à densidade populacional do patógeno.

Lacava et al. (2004) transformaram a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, endofítica, com o gene *gfp*, para comparar a forma de colonização em *Catharanthus roseus* e *Citrus sinensis*, pelo endófito marcado, sendo observado que, utilizando as técnicas de isolamento e microscopia de fluorescência, houve uma constatação de uma forma padrão de colonização, inferindo que os resultados conseguidos com *C. roseus* poderiam ser usados para um maior entendimento da interação entre microrganismo endofítico e a planta hospedeira, no caso o citrus.

Similarmente, Quecine et al. (2012) conseguiram demonstrar que a linhagem bacteriana *Pantoea agglomerans* 33.1 isolada de *Eucalyptos grandis*, transformada com o plasmídeo integrativo pNKGFP, foi capaz de colonizar por meio de colonização cruzada a rizosfera, raiz e parte aérea de cana-de-açúcar, promovendo o crescimento de cana-de-açúcar, sem afetar a densidade bacteriana associada ao hospedeiro.

Dourado et al. (2013), transformaram *Burkholderia* sp. com o plasmídeo pCM88, que confere uma fluorescência verde aos mutantes e resistência a tetraciclina. Inocularam os transformantes em plantas de tomate e conseguiram observar o biofilme formado na superfície das raízes amostradas após 42 dias da inoculação por microscopia de fluorescência. De maneira semelhante, Sun et al. (2014) marcaram *Pseudomonas* sp. com o plasmídeo pBBRGFP-45. A linhagem foi inoculada em plantas de azevém e após 6 dias, a colonização da linhagem foi observada em raízes, caules e folhas por microscopia de fluorescência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens e condições de cultivo

Foram utilizadas nos ensaios de promoção de crescimento as linhagens *B. ambifaria* (RZ2MS16) e *Bacillus* sp. (RZ2MS9), previamente isoladas da rizosfera de guaranazeiro *Paullinia cupuna* [(Mart.) Ducke], e descritas como promotoras de crescimento em soja e milho (BATISTA, 2013). Essas linhagens pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”. A linhagem RZ2MS16 foi também utilizada, por meio de marcação, nos ensaios de monitoramento *in vivo*. Como bioinoculantes foram também utilizadas linhagens comerciais: *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5080) e *Azospirillum brasilense* (Ab-v5 e Ab-v6) descritas como promotoras de crescimento em soja e milho, respectivamente. Essas linhagens foram gentilmente cedidas pela Pesquisadora Mariângela Hungria, da Embrapa soja de Londrina- PR. Todas as bactérias foram inicialmente identificadas por meio de sequenciamento do gene 16S do rDNA, para constatar suas identidades antes de iniciar os experimentos (dado não apresentado).

Routineiramente, as linhagens bacterianas foram crescidas em de meio de cultura apropriado: meio de cultura Levedura Manitol (LM) (VINCENT, 1970) para as bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (SEMIA5079 e SEMIA5080); Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK; FRITSCH; MANITATIS, 1989) para *B. ambifaria* (RZ2MS16) e *Bacillus* sp.(RZ2MS9); e meio DYGS (RODRIGUEZ et al., 2004) para as linhagens de *Azospirillum* (Ab-v5 e Ab-v6) à 28°C. Sendo estas linhagens estocadas em meio específico, de acordo com as necessidades nutricionais do gênero, suplementados com glicerol (20%) à -20°C.

3.2 Plasmídeos utilizados

Inicialmente todas as linhagens bacterianas RZ2MS16, SEMIA5080, SEMIA5079, Ab-V5 e Ab-V6 foram geneticamente transformadas, marcadas com os genes de fluorescência. Esta marcação foi realizada para o acompanhamento de algumas linhagens selecionadas à posteriori, durante o processo de interação associados às culturas da soja e milho. Os plasmídeos utilizados foram: pNKGFP (FERREIRA et al., 2008) que possui o gene de expressão da proteína GFP e resistência ao antibiótico canamicina (Green Fluorescent Protein); pSW4CFP (SASTALLA et al., 2009) que possui o gene de expressão da proteína CFP e resistência ao antibiótico canamicina e ampicilina (Cean Fluorescent Protein); o

plasmídeo pWM1013, que contém o gene de expressão da proteína Dsred e resistência ao antibiótico canamicina (BRANDL; MANDRELL, 2002); e a proteína YFP e resistência ao antibiótico canamicina e ampicilina (Yellow Fluorescent Protein) com o plasmídeo pSW4-YFP (SASTALLA et al., 2009) (Tabela 1).

Os plasmídeos pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” e foram mantidos e amplificados em linhagens de *E. coli* apropriadas. Para a extração dos plasmídeos, *E. coli* foi crescida em 5 mL de meio *Luria-Bertani* (LB) adicionado com a marca de resistência específica de cada plasmídeo e incubada a 37°C sob agitação (200 rpm) por 18 horas. O precipitado obtido pela centrifugação dessas suspensões bacterianas foi utilizado na extração plasmidial por Kit de Extração (Mobio).

A integridade e a concentração dos DNAs e plasmídeos extraídos durante o trabalho foram verificadas em gel de agarose 1%, a 3 volts.cm⁻¹ juntamente com o marcador de peso molecular λ (Fermentas). Após a eletroforese, o gel foi foto documentado sobre luz UV.

Tabela 1 - Plasmídeos utilizados para transformação

Plasmídeos	Características relevantes	Bactéria transformada
pNKGFP	Plasmídeo integrativo; 5,1 kb; origem de replicação R6K; contendo <i>mini-Tn10</i> , gene <i>gfp</i> e resistência Km ^r	RZ2MS16
pSW4-YFP	Plasmídeo replicativo; 7,3 kb; origem de replicação ColE1 ; contendo gene <i>yfp</i> e resistência Km ^r e Amp ^r	SEMIA 5080 e Ab-v5
pSW4-CFP	Plasmídeo replicativo; 7,3 Kb; origem de replicação ColE1, contendo gene <i>cfp</i> e resistência Km ^r e Amp ^r	SEMIA 5080 e Ab-v6
pWM1013	Plasmídeo replicativo; origem de replicação ColE1, contendo gene <i>Dsred</i> e resistência Km ^r	SEMIA 5080, Ab-v5 e Ab-v6

3.3 Marcação para monitoramento da colonização das culturas pelas linhagens

A linhagem RZ2MS16 e as linhagens comerciais (SEMIA5079, SEMIA5080, Ab-v5 e Ab-v6) foram marcadas por meio da transformação para expressão heteróloga de genes de

fluorescência visando seu monitoramento durante a colonização de milho e soja, a partir da inserção de proteínas de fluorescência. Assim, antes da obtenção das células competentes e eletroporação, visando a otimização da transformação e posterior seleção da linhagens marcadas para ensaios *in vivo*, foram obtidas a curva de crescimento bacteriana, antibiograma e realizado o ensaio de antibiose entre as linhagens bacterianas como descrito abaixo.

3.3.1 Curva de crescimento bacteriano

Foram obtidas as curvas de crescimento das linhagens RZ2MS16, SEMIA5079, SEMIA5080, Ab-V5 e Ab-V6 para a posterior análise da fase de crescimento considerada ideal para a transformação de cada bactéria, sendo esta, a fase *log* do crescimento microbiano. Para tanto, as linhagens bacterianas RZ2MS16, SEMIA5079, SEMIA5080, Ab-V5 e Ab-V6 foram cultivadas em meio de cultura sólido apropriado para cada espécie. Sendo posteriormente inoculadas, em triplicatas, em 50 µL de meio líquido apropriado, onde foram incubadas à 28°C e 150 rpm. As leituras de densidade ótica se realizaram em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Anersham Pharmacia Biotech), com comprimento de onda de 600 nm de absorbância. O intervalo entre uma leitura e outra, para a formação da curva de crescimento, e o tempo de incubação, foram feitos de acordo com a velocidade de crescimento da bactéria.

Posteriormente, foram também obtidas as curvas de crescimento dos mutantes: RZ2MS16:pNKGFP1, RZ2MS16:pNKGFP2, RZ2MS16:pNKGFP3, RZ2MS16:pNKGFP4, SEMIA5080:pWM1013 e Ab-v5:pWM1013 selecionados para ensaios *in vivo*. A comparação dos mesmos com o tipo selvagem foi realizada, afim de observar se houve ou não influência da inserção do plasmídeo no crescimento bacteriano.

3.3.2 Antibiograma

Visando verificar a resistência natural das linhagens para a escolha do plasmídeo a ser utilizado na transformação, as bactérias foram avaliadas quanto à capacidade de resistência aos antibióticos canamicina (KAN), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CLOR) e tetraciclina (TETRA). Inicialmente, as linhagens foram cultivadas em meio de cultura sólido apropriado e posteriormente repicadas em meio acrescido de diferentes concentrações dos antibióticos: 0, 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹. Utilizou-se 3 repetições biológicas por tratamento. O período de incubação dependeu da velocidade de crescimento de cada linhagem à 28°C.

3.3.3 Teste de antibiose entre as linhagens

Finalmente, foi verificada a possível antibiose entre as linhagens estudadas para verificar se a linhagem RZ2MS16 pode inibir o crescimento dos bioinoculantes, *in vitro*. As bactérias foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5mL de meio líquido apropriado por um período, de acordo com suas velocidades de crescimento e temperatura ideal, para a obtenção do inóculo. Inicialmente, as linhagens foram cultivadas separadamente. A partir deste inóculo, cada bactéria foi transferida para *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio líquido apropriado, obtendo-se uma concentração final de 10^8 UFC.mL⁻¹. Para os testes de antibiose foram utilizadas placas com meio sólido apropriado, sendo inoculados 20 µL da suspensão de cada linhagem, onde em cada placa se inoculou as bactérias comerciais acrescido da suspensão da RZ2MS16. Todas as possíveis formas de interação foram avaliadas, realizando-as em quadruplicatas. As placas foram incubadas até se observar o crescimento das linhagens, à 28°C. Observou-se a presença ou ausência do halo de inibição de crescimento formado ao redor das linhagens, com indício de atividade antagonista entre as bactérias. Para o controle positivo de inibição bacteriano, foi utilizado o antibiótico apropriado adicionado ao meio sem inoculação (Figura 1).

Figura 1 - Teste de antibiose realizado com RZ2MS16 e Ab-v5. **1** - Meio controle, plaqueado e homogeneizado com o inóculo; **2** - Controle com antibiótico (canamicina), com formação de halo; **3 e 4** - Crescimento das bactérias, mostrando que não há antagonismo entre as linhagens analisadas

3.3.4 Obtenção de células competentes

Para a obtenção de células competentes das bactérias, as linhagens RZ2MS16 SEMIA5079, SEMIA5080, Ab-v5 e Ab-v6 foram crescidas, individualmente, em 5mL de meio líquido apropriado, sendo incubadas por um período, específico de cada linhagem, a 250 rpm à 28°C. Após o crescimento, 1 mL do inóculo foi transferido para 50 mL de meio líquido apropriado e incubados à 28°C a 180 rpm até atingir a densidade óptica (OD) de 0,8; 0,6 e 0,12, para RZ2MS16; SEMIA5079 e SEMIA5080; e Ab-v5 e Ab-v6, respectivamente. Esta densidade foi verificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Anersham Pharmacia Biotech) utilizando o comprimento de onda de leitura de 600nm. As células foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuscitado em água deionizada e esterilizada, realizando-se novamente a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuscitado em glicerol 10% (OD_{600nm}= 0,120) para diluição de 500X e centrifugado. A lavagem com glicerol foi realizada duas vezes. O material foi distribuído em alíquotas de 100 µL e procedeu-se da eletroporação.

O plasmídeo quantificado (10 ng) foi adicionado a 100 µL da cultura eletrocompetente e eletroporado utilizando os parâmetros: - 2,5 kV, 25 µF, 200/400 Ω, cubetas de 0,2 cm, por meio de eletroporador Gene Pulser BioRad. As células foram inoculadas em meio sólido apropriado adicionado de antibiótico e concentração apropriados até observar o aparecimento de colônias, à 28°C.

Confirmada a resistência ao antibiótico e observado a fluorescência das células transformadas, foram selecionadas aleatoriamente alguns mutantes de cada linhagem, denominados RZ2MS16:pNKGFP, SEMIA5080:pWM1013 e Ab-v5:pWM1013, para ensaios *in vivo*, estes foram estocados (Item 3.1) para análises futuras. Para as linhagens utilizadas em ensaios *in vivo*: RZ2MS16:pNKGFP, SEMIA5080:pWM1013 e Ab-v5:pWM1013 foram obtidas a curva de crescimento. A comparação dos mesmos com o tipo selvagem foi realizada de acordo com o item 3.3.1, afim de observar se houve ou não influência do plasmídeo no crescimento bacteriano.

3.4 Teste de estabilidade de expressão das fluorescências

Colônias das linhagens transformadas e selecionadas para ensaios *in vivo* (RZ2MS16:pNKGFP, SEMIA5080:pWM1013 e Ab-v5:pWM1013) foram transferidas para tubos com 5 mL de meio líquido apropriado acrescido do antibiótico em concentração

adequada. Estes foram incubados sob agitação constante de 180 rpm à 28° C, até o final da fase *log*. Posteriormente, 50 µL da cultura bacteriana foi transferido para 50 mL de meio apropriado sem antibiótico. Sendo novamente, cultivadas como citado anteriormente. Alíquotas das culturas foram diluídas em série (10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11}) e semeadas em placas de meio sólido apropriado sem antibiótico e incubadas a 28° C.

Após 24-48 horas 100 colônias foram escolhidas aleatoriamente, sendo estas repicadas em meio sólido apropriado com antibiótico, e incubadas por 24-48 horas a 28° C. O número de bactérias portadoras do plasmídeo e que expressaram o gene de fluorescência foram avaliadas. O mesmo procedimento foi realizado para se observar a estabilidade de expressão após 24, 48, 96 e 120 horas na ausência do antibiótico para Ab-v5:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP; e após 48, 96, 166 e 214 horas para SEMIA5080:pWM1013.

3.5 Southern Blot

O *Southern Blot* foi realizado para verificação da inserção do fragmento do plasmídeo pNKGFP, bem como quantas vezes foi inserido, no cromossomo da linhagem RZ2MS16.

3.5.1 Extração de DNA bacteriano

As linhagens RZ2MS16, RZ2MS16:pNKGFP1, RZ2MS16:pNKGFP2, RZ2MS16:pNKGFP3 e RZ2MS16:pNKGFP4 foram crescidas separadamente em 5mL de meio LB à 28°C por 24 horas sob agitação constante de 180 rpm. No precipitado obtido com a centrifugação de cada suspensão foi agitada no homogeneizador de células (Ação Científica) por 30 segundos, a 3500 g e em seguida centrifugada por 10 minutos a 10000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 500µL de fenol, a suspensão foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo com 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1) (v:v), homogeneizado, centrifugado e coletado, sendo então adicionado 0,1 do volume de NaCl (5M) e 0,6 do volume de isopropanol. A mistura foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 10000 g. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente *overnight*. Então foi ressuspense em 30 µL de água deionizada esterilizada.

3.5.2 Restrição do DNA genômico e transferência para membrana de náilon

Os DNA's extraídos foram clivados com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen). As reações de restrição em um volume total de 250 µL, contendo 7,5 µg de DNA bacteriano ou 500 ng do plsmídeo pNKGFP, 25 µL de Tampão React[®] 3 10X e 40U da enzima *EcoRI*

foram incubadas a 37°C durante 12 horas. Para concentrar foi realizada uma precipitação adicionando 25 µL de acetato de amônio (7,8M) e 625 µL de álcool absoluto. Após incubação a -20°C por 12 horas, o material foi centrifugado (10000 g por 40 minutos à 4°C). O sobrenadante foi descartado e adicionado 700 µL de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos (10000 g, 4°C). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado seco a 37°C. Após a secagem, o DNA hidrolisado foi ressuspensão em 32 µL de TE e 8 µL de sacarose 40%. Os 40 µL de DNA foram aplicados em gel de agarose 1%. Foi utilizado como marcador molecular 40 µL do DNA Ladder 1kb (0,2 µg. µL⁻¹) (Fermentas). A eletroforese foi realizada a 3 volts.cm⁻¹. Após a eletroforese, o gel foi foto documentado sobre luz UV.

O gel de agarose foi então submetido à depurinização por incubação em 500mL de solução HCl 0,25M por 10 minutos. Após este período, o gel foi lavado com água destilada e transferido para 500mL de solução desnaturante (NaOH 0,5M; NaCl 1,5M) por 30 min. O gel foi lavado novamente com água destilada e em seguida por 30 minutos. O gel foi lavado novamente com água destilada e em seguida neutralizado por incubação por 15 minutos em 250mL de solução neutralizadora (Tris-HCl 0,5M; NaCl 1,5M; EDTA 0,001M; pH 7,2), com agitação branda à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Por capilaridade, o DNA contido no gel foi transferido para a membrana de náilon (Hybond-N+ - Amersham), sendo utilizada a solução de transferência SSC 20X (NaCl 3M; citrato de sódio 0,3M; pH 7,0). O DNA foi fixado à membrana por aquecimento (80°C por 2 horas) e então armazenada à temperatura ambiente.

3.5.3 Preparo da sonda de hibridação molecular

Para a hibridação foi utilizado como sonda um fragmento de DNA contendo uma região interna ao sítio de inserção do plasmídeo pNKGFP. Este fragmento foi obtido por PCR com os *primers* PPNKF (5'-CCTTCATTACAGAAACGGC-3') e PPNKRII (5'-GGTGATGCGTGATCTGATCC-3') (QUECINE et al. 2012). A marcação da sonda e a hibridação foram realizados segundo o protocolo do kit Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (GE Healthcare).

3.6 Atividade sinérgica da RPCPs e bioinoculantes na promoção de crescimento vegetal

Para avaliar a eficiência da inoculação das RPCPs e bioinoculantes quanto à promoção de crescimento da soja e milho, foi realizado um experimento em casa de vegetação com duração de 30 dias para a soja, e de 60 dias para o milho. A casa pertence ao Departamento de

Genética da Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, no município de Piracicaba - SP. As sementes de soja cultivar 97R21 DuPont® Pioneer® foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, e as sementes de milho híbrido P4285H DuPont® Pioneer® (H1) e 2B587HR DOW® (H2) pelo Prof. Dr. Roberto Fritsche-Neto, ambos docentes do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

3.6.1 Eficiência das RPCPs e rizóbios quanto à promoção de crescimento em soja

Cada linhagem foi multiplicada, separadamente, em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido LB para RZ2MS16 e RZ2MS9 e meio LM para os rizóbios (SEMIA5079 e SEMIA5080), submetendo-os a agitação constante de 180 rpm à 28°C para a RZ2MS16, e à 30°C para os rizóbios, até o final da fase *log*. Em seguida foi transferido uma alíquota de aproximadamente 1 mL do pré inóculo para *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio líquido apropriado, sendo novamente levados para agitação constante (180 rpm) à 28°C até atingirem uma concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹. As sementes foram lavadas e imediatamente transferidas para uma solução de sacarose (10%). Estas permaneceram na solução por 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram imersas e mantidas nas suspensões bacterianas, individuais e em consórcio, em frascos de vidro de 200 mL, por aproximadamente 20 minutos em temperatura ambiente e imediatamente semeadas em vasos com 1,6 kg de substrato comercial da marca Bioplant® (farelado grosso composto por turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de Pinus) e mantidos em casa de vegetação.

Como tratamentos, teve-se: **T1-** RZ2MS16, **T2-** RZ2MS16 + SEMIA5079, **T3-** RZ2MS16 + SEMIA5080, **T4-** SEMIA5079, **T5-** SEMIA5080, **T6-** RZ2MS9, **T7-** RZ2MS9 + SEMIA5079, **T8-** RZ2MS9 + SEMIA5080, **T9-** Controle. Como controle utilizou-se a mistura dos meios de cultura LB e LM sem crescimento bacteriano, para a aplicação nas sementes.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, 14 repetições por tratamento. Foram colocadas 4 sementes por vaso. As plantas foram irrigadas 2 vezes por dia em sistema automático e nenhuma solução nutritiva foi adicionada às mesmas. Todas as sementes germinaram e possuíram desenvolvimento semelhante, o desbaste foi realizado 7 dias após a emergência (DAE), restando somente uma planta por vaso. Trinta DAE, tempo necessário para que se observassem diferenças de crescimento, mas sem que houvesse o comprometimento da raiz pelo espaço disponível, as plantas foram colhidas e avaliadas.

3.6.1.1 Parâmetros avaliados quanto à promoção de crescimento da soja

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 régua milimetrada. O sistema radicular, a parte aérea e os nódulos de cada planta foram acondicionados em sacos de papel para posterior secagem em estufa, com ventilação forçada, à 50°C, até atingirem o peso constante. Em seguida determinou-se o peso seco da parte aérea (PSPA), o peso seco do sistema radicular (PSSR) e o peso seco dos nódulos (PSN) com o auxílio de uma balança analítica. Também foi analisado o número de nódulos em cada planta (NN) por contagem manual.

3.6.2 Eficiência das RPCPs e Ab-v5 quanto à promoção de crescimento em milho

Cada linhagem foi multiplicada individualmente em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido LB para RZ2MS16 e RZ2MS9 e meio DYGS para Ab-v5, submetendo-os a agitação constante de 180 rpm à 28°C para a RZ2MS16 e RZ2MS9, e à 35°C para Ab-v5, até atingirem o final da fase *log*. Em seguida, uma alíquota de aproximadamente 1 mL do pré inóculo foi transferido para *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio líquido apropriado e incubados sob agitação constante (180 rpm) à 28°C até atingir a concentração aproximada de 10^8 UFC.mL⁻¹. As sementes foram lavadas e imediatamente transferidas para uma solução de sacarose (10%). Estas permaneceram na solução por 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram imersas e mantidas nas suspensões bacterianas, individuais e em consórcio, em frascos de vidro de 200 mL, por aproximadamente 20 minutos em temperatura ambiente, sendo depois semeadas.

Foram avaliados dois híbridos de milho (H1 e H2) e duas concentrações de N, um com a quantidade total do nitrogênio necessário (+N) e outro com 30% do total (-N).

As sementes foram transferidas para vasos com 2,4 kg de solo argiloso coletado na Estação Experimental do Departamento de Genética da ESALQ/USP, situado no município de Piracicaba-SP. Foi realizada uma adubação prévia com nitrogênio, fósforo e potássio, correspondendo, por vaso, a 15,2g de Super Simples (como fonte de fósforo) e 2,28g de KCl (como fonte de potássio). Quanto ao nitrogênio, se fez duas aplicações diferentes, uma com o total do nitrogênio necessário, onde se colocou 10,94g de uréia; e outra com 30% da aplicação total, com 3,28g de uréia.

Desta forma, os tratamentos foram: **T1**- RZ2MS16, H1, +N; **T2**- RZ2MS16 + Ab-v5, H1, +N; **T3**- Ab-v5, H1, +N; **T4**- Controle, H1, +N; **T5**- RZ2MS16, H1, -N; **T6** – RZ2MS16

+ Ab-v5, H1, -N; **T7** – Ab-v5, H1, -N; **T8**- RZ2MS9, H1, -N; **T9** –RZ2MS9 + Ab-v5, H1, -N; **T10** – Controle, H1, -N; **T11**- RZ2MS16, H2, +N; **T12**- RZ2MS16 + Ab-v5, H2, +N; **T13** - Ab-v5, H2, +N; **T14**- Controle, H2, +N; **T15**- RZ2MS16, H2, -N; **T16**- RZ2MS16 + Ab-v5, H2, -N; **T17**-Ab-v5, H2, -N; **T18**- RZ2MS9, H2, -N; **T19**- RZ2MS9 + Ab-v5, H2, -N e **T20**- Controle, H2, -N. Para os controles utilizou-se uma mistura dos meios de cultura LB e DYGS sem crescimento bacteriano, para a aplicação nas sementes.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, 10 repetições por tratamento. Foram semeadas 4 sementes por vaso, sendo irrigadas 2 vezes por dia em sistema automático e nenhuma solução nutritiva foi adicionada às mesmas após a semeadura. Todas as sementes germinaram e possuíram desenvolvimento semelhante, o desbaste foi realizado 7 dias após a emergência (DAE), restando somente uma planta por vaso. Sessenta DAE, tempo necessário para que se observassem diferenças de crescimento, mas sem que houvesse o comprometimento da raiz pelo espaço disponível, as plantas foram colhidas e avaliadas.

3.6.2.1 Parâmetros avaliados quanto à promoção de crescimento do milho

Imediatamente após a colheita, separou-se o sistema radicular da parte aérea da planta, sendo ambos lavados em água corrente. No mesmo dia foi aferido o diâmetro dos caules (DC), número de folhas (NF) e coletou-se dados para análise fotossintética (AFS), com o auxílio do aparelho JUNIOR-PAM (Teaching Chlorophyll Fluorometer) WALZ®.

A parte aérea de cada planta foi acondicionada em sacos de papel para posterior secagem em estufa, com ventilação forçada, a 50°C, até atingirem o peso constante. Em seguida determinou-se o peso seco da parte aérea.

As raízes foram lavadas para a retirada de solo e impurezas remanescentes, sendo em seguida mergulhadas em recipientes contendo água e álcool numa proporção de 4:1 (v:v) propiciando melhor conservação das raízes. Para as leituras dos parâmetros a serem avaliados, as raízes foram dispostas em uma cuba de acrílico de 20 centímetros de largura por 30 centímetros de comprimento contendo água, e desta forma foram obtidas imagens em três dimensões com uma mínima sobreposição de raízes. As leituras foram realizadas a partir do *software* WinRHIZO™ (Analysis of Washed Roots and Arabidopsis Seedlings) acoplado à um scanner Epson® Expression XL 11000. Os dados obtidos foram referentes à características morfológicas das raízes, como: diâmetro da raiz (DR), comprimento da raiz (CR), volume da raiz (VR), área superficial da raiz (ASR) e área projetada da raiz (APR).

3.7 Monitoramento da colonização de milho e soja pela linhagem RZ2MS16:pNKGFP em consórcio com bioinoculantes comerciais

Para monitorar a colonização de milho e/ou soja foram selecionadas as linhagens RZ2MS16:pNKGFP2, SEMIA5080:pWM1013 e Ab-v5:pWM1013, sendo realizado um experimento em casa de vegetação. As plantas foram amostradas com 15 e 30 dias após a inoculação (DAI) sendo realizadas análises de microscopia de fluorescência e reisolamento das bactérias. A casa de vegetação fica instalada na Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ (ESALQ/USP), no Departamento de Genética, município de Piracicaba - SP. As sementes de soja cultivar 97R21 DuPont® Pioneer® foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, e as sementes do milho híbrido P4285H DuPont® Pioneer® pelo Prof. Dr. Roberto Fritsche-Neto, ambos docentes do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

3.7.1 Bacterização das sementes

As linhagens RZ2MS16:pNKGFP2, SEMIA5080:pWM1013 e Ab-v5:pWM1013 foram multiplicadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido LB para RZ2MS16:pNKGFP2, meio LM para SEMIA5080:pWM1013 e meio DYGS para Abv5:pWM1013, submetendo-os a agitação constante de 180 rpm à 28°C para a RZ2MS16:pNKGFP2, à 30°C para os SEMIA5080:pWM1013 e à 35°C para Ab-v5:pWM1013 até atingirem a fase *log*. Em seguida foi transferido uma alíquota de aproximadamente 1 mL do pré inóculo para *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio líquido apropriado, sendo novamente levados para agitação constante (180 rpm) à 28°C até atingirem uma concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹. As sementes foram lavadas e imediatamente transferidas para uma solução de sacarose (10%). Estas permaneceram na solução por 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram imersas e mantidas nas suspensões bacterianas, individuais e em consórcio, em frascos de vidro de 200 mL, por aproximadamente 20 minutos em temperatura ambiente e imediatamente semeadas em vasos com 1,6 kg de substrato comercial da marca Bioplant® (farelado grosso composto por turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de Pinus) e mantidos em casa de vegetação.

O experimento foi inteiramente casualizado e amostradas em cada tempo 4 plantas por tratamento, sendo os mesmos para a soja: **T1**- RZ2MS16:pNKGFP2, **T2**- SEMIA5080:pWM1013, **T3**- RZ2MS16:pNKGFP2 + SEMIA5080:pWM1013 e **T4**- Controle. Para o controle, utilizou-se uma mistura dos meios de cultura LB e LM sem crescimento bacteriano, para a aplicação nas sementes.

E para o milho: **T1-** RZ2MS16:pNKGFP2, **T2-** Ab-v5:pWM1013, **T3-** RZ2MS16:pNKGFP2 + Ab-v5:pWM1013 e **T4-** Controle. Para o controle, utilizou-se uma mistura dos meios de cultura LB e DYGS sem crescimento bacteriano, para a aplicação nas sementes.

3.7.2 Análise por Microscopia Óptica de Fluorescência (MOF)

Os materiais obtidos a partir dos experimentos conduzidos em casa de vegetação (parte aérea e raiz das plantas de milho e soja) foram processados sendo realizados cortes bem finos e colocados em lâmina com água e imediatamente observados. A captura da imagem se fez pela câmera CCD acoplada ao Microscópio de Fluorescência Axiophot, com utilização do filtro para excitação em luz ultravioleta. Foram amostradas quatro plantas de cada cultura por tratamento.

O reisolamento para quantificação da densidade bacteriana nos tratamentos onde as linhagens marcadas foram inoculadas individualmente foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Quecine et al. (2012).

3.8 Análise estatística

A análise estatística de todos os dados obtidos foi realizada de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância, para comparação de médias. Foi utilizado o programa SAS versão 9.1, considerando os delineamentos experimentais como inteiramente casualizados e/ou subfatorial para amostragens temporais.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento bacteriano

A linhagem RZ2MS16 apresentou o início da fase *log* aproximadamente às 3 horas após inoculação (h.a.i) com uma densidade ótica de aproximadamente 0,5. A mesma alcançou a fase estacionária aproximadamente às 24 h.a.i. (Figura 2).

Figura 2 - Curva de crescimento da RZ2MS16 observada durante 26 horas de cultivo à 28°C em meio LB sob agitação constante (150 rpm) à 28°C. As leituras foram realizadas em triplicatas com o auxílio de um espectrofotômetro, medida a um comprimento de onda de 600nm. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

As linhagens Ab-v5, Ab-v6 e SEMIA 5080 atingiram o início da sua fase *log* aproximadamente às 8 h.a.i., com uma densidade ótica próxima a 0,5 para Ab-v5 e Ab-v6; e próximo de 0,4 para SEMIA5080. Já a linhagem SEMIA5079 foi avaliada por um período de 96 horas de cultivo. Esta atingiu a fase *log* às 40 h.a.i, com uma densidade ótica de 0,4 (Figura 3), apresentando um crescimento *in vitro* mais lento quando comparada com as demais bactérias analisadas.

Figura 3 - Curva de crescimento bacteriano, mensurando a densidade ótica sob medição do comprimento de onda (600nm) por tempo de cultivo. **A e B** – *Azospirillum brasiliense* (Ab-v5 e Ab-v6), **C** – *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA5079) e **D** - *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA5080). Meio LM para *Bradyrhizobium* spp. sob agitação constante de 150 rpm à 30°C. Meio DYGS para *A. brasiliense* sob agitação constante de 150 rpm à 35°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

4.2 Antibiograma

Todas as linhagens bacterianas apresentaram crescimento normal em meio sem antibiótico. As linhagens RZ2MS16, Ab-v5, Ab-v6, SEMIA5079 e SEMIA5080 apresentaram sensibilidade ao antibiótico KAN em todas as concentrações avaliadas. Entretanto, essas linhagens apresentaram resistência ao antibiótico AMP em todas as concentrações analisadas. Já a linhagem SEMIA5080 apresentou-se sensível à ambos os antibióticos em todas as concentrações avaliadas. As linhagens RZ2MS16 e Ab-v5 se mostraram sensíveis à TETRA, porém em relação ao CLOR, a Ab-v5 é resistente e a RZ2MS16 sensível (Tabela 2).

Tabela 2 - Antibiograma das linhagens bacterianas

Bactéria	Concentração antibióticos**												
	Contr ole	Canamicina			Ampicilina			Cloranfenicol			Tetraciclina		
		50	100	200	50	100	200	50	100	200	50	100	200
Ab-v5	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Ab-v6	+	-	-	-	+	+	+	*	*	*	*	*	*
SEMIA 5079	+	-	-	-	+	+	+	*	*	*	*	*	*
RZ2MS16	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SEMIA 5080	+	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
(+) Cresciment o positivo (-) Cresciment o negativo (*) Teste realizado	não												

** Os ensaios foram realizados em triplicatas, com os antibióticos ampicilina (AMP), canamicina (KAN), cloranfenicol (CLOR) e tetraciclina (TETRA) nas concentrações de 0 (controle), 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as linhagens RZ2MS16, Ab-v5, Ab-v6, SEMIA5079 e SEMIA5080.

4.3 Teste de antibiose

Foi possível observar que não há efeito da RZ2MS16 no crescimento de Ab-v5 e Ab-v6, no entanto as linhagens Ab-v5 e Ab-v6 apresentaram efeito inibitório do crescimento bacteriano, havendo uma inibição do crescimento quando coinoculadas juntas. Como

esperado, no controle negativo todas as linhagens inoculadas e homogeneizadas no meio de cultura obtiveram um crescimento normal. Já no controle com antibiótico as linhagens apresentaram halo onde o antibiótico foi adicionado (Tabela 3).

Tabela 3 - Teste de antibiose entre as linhagens RZ2MS16, Ab-v5 e Ab-v6. Realizado com todas as possibilidades de interação, em triplicatas

	RZ2MS16	Ab-v6	Controle meio	Controle antibiótico ^(*)
Ab-v5	+	+	+	+
	RZ2MS16	Ab-v5	Controle meio	Controle antibiótico
Ab-v6	+	-	+	+
	Ab-v5	Ab-v6	Controle meio	Controle antibiótico
RZ2MS16	+	+	+	+

(+) Crescimento positivo

(-) Crescimento negativo/sem formação de halo

(*) Com a formação de halo de inibição – canamicina (100 µg mL⁻¹)

Foi possível observar nos testes realizados que não há efeito da RZ2MS16 sob o crescimento da SEMIA5079 e SEMIA5080, no entanto houve um efeito inibitório entre as linhagens SEMIA5079 e SEMIA5080.

Como esperado, no controle negativo todas as linhagens inoculadas e homogeneizadas no meio de cultura obtiveram um crescimento normal. Já no controle com antibiótico as linhagens apresentaram halo onde o antibiótico foi adicionado (Tabela 4).

Tabela 4 - Teste de antibiose entre as linhagens RZ2MS16, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Realizado com todas as possibilidades de interação, em triplicatas

	RZ2MS16	SEMIA 5080	Controle meio	Controle antibiótico ^(*)
SEMIA 5079	+	-	+	+
	RZ2MS16	SEMIA 5079	Controle meio	Controle antibiótico
SEMIA 5080	+	-	+	+
	SEMIA 5079	SEMIA 5080	Controle meio	Controle antibiótico
RZ2MS16	+	-	+	+

(+) Crescimento positivo

(-) Crescimento negativo/sem formação de halo

(*) Com a formação de halo de inibição – canamicina (100 µg mL⁻¹)

4.4 Análise molecular dos transformantes da linhagem RZ2MS16

A RZ2MS16 foi transformada com o plasmídeo pNKGFP, integrativo e que confere a fluorescência de coloração verde às células. No total, foram reconhecidos 4 mutantes RZ2MS16:pNKGFP. A confirmação da inserção do plasmídeo na bactéria foi vista a partir da PCR, onde se observou, em gel de agarose, a presença de bandas que indicam o sucesso da transformação, tendo-se o pNKGFP como controle positivo e a RZ2MS16 selvagem como controle negativo (Figura 4A).

A inserção e a quantidade de fragmentos plasmidiais no genoma bacteriano das linhagens RZ2MS16:pNKGFP1, RZ2MS16:pNKGFP2, RZ2MS16:pNKGFP3 e RZ2MS16:pNKGFP4 foram confirmadas por *Southern Blot*. No mutante RZ2MS16:pNKGFP1 ocorreram duas inserções, no mutante RZ2MS16:pNKGFP2 uma única inserção, no mutante RZ2MS16:pNKGFP3 uma inserção, e no mutante RZ2MS16:pNKGFP4 apareceram 4 inserções do fragmento no genoma bacteriano. O isolado RZ2MS16 não apresentou banda detectável pela sonda marcada durante a hibridação (Figura 4B).

Para os testes em casa de vegetação, visando o monitoramento da linhagem nos tecidos das plantas, foi escolhido o mutante RZ2MS16:pNKGFP2, por este apresentar uma única inserção do fragmento em seu genoma.

Figura 4 - Análise molecular dos transformantes da linhagem *B. ambifaria* (RZ2MS16) (A) Identificação dos transformantes por PCR utilizando os *primers* PPNKF (5'- CCTTCATTACAGAAACGGC-3') e PPNKRII (5'- GGTGATGCGTGATCTGATCC-3'). 1 - marcador molecular Ladder 1kb (0,2µg.µL⁻¹); 2 - RZ2MS16; 3 - RZ2MS16:pNKGFP1; 4 - RZ2MS16:pNKGFP2; 5 - RZ2MS16:pNKGFP3; 6 - RZ2MS16:pNKGFP4; 7 - plasmídeo pNKGFP. (B) *Southern Blot* do plasmídeo pNKGFP e do DNA cromossomal de *B. ambifaria* digeridos por EcoRI e hibridizados com a sonda, fragmento de DNA obtida a partir dos *primers* PPNKF (5'-CCTTCATTACAGAAACGGC-3') e PPNKRII (5'-GGTGATGCGTGATCTGATCC-3'). 1 - RZ2MS16; 2 - RZ2MS16:pNKGFP1; 3 - RZ2MS16:pNKGFP2; 4 - RZ2MS16:pNKGFP3; 5 - RZ2MS16:pNKGFP4; 6 - plasmídeo pNKGFP

Em relação às demais linhagens bacterianas transformadas, o plasmídeo pSW4-YFP, que confere fluorescência amarela aos mutantes, foi utilizado para eletropor células competentes de SEMIA5079, SEMIA 5080 e Ab-v5. Mas somente as linhagens SEMIA5080 e SEMIA5079 apresentaram presença de mutantes no meio com antibiótico. Já com o plasmídeo pSW4-CFP, que confere fluorescência ciano aos mutantes, foi utilizado na eletroporação das células competentes de SEMIA5079, SEMIA 5080 e Ab-v5, mas somente a SEMIA5079 apresentou células resistentes ao antibiótico KAN ou AMP.

Finalmente, o plasmídeo pWM1013, que confere uma fluorescência vermelha aos mutantes transformados, foi utilizado na eletroporação de células competentes de SEMIA5079, SEMIA 5080, Ab-v5 e Ab-v6, sendo obtidos transformantes resistentes ao antibiótico KAN para todas as linhagens bacterianas.

A maior eficiência de transformação encontrada entre as linhagens utilizadas foi na RZ2MS16 com o pNKGFP, onde se obteve um valor de 55 transformantes μg^{-1} de DNA (Tabela 5).

Tabela 5 - Eficiência da transformação das linhagens bacterianas

Bactéria	Plasmídeo utilizado	Eficiência da transformação*
SEMIA5079	pSW4-YFP	6,25 transformantes μg^{-1} de DNA
	pSW4-CFP	29 transformantes μg^{-1} de DNA
	pWM1013	0,15 transformantes μg^{-1} de DNA
SEMIA5080	pSW4-YFP	0,25 transformantes μg^{-1} de DNA
	pSW4-CFP	Não houve mutante
	pWM1013	0,5 transformantes μg^{-1} de DNA
Ab-v5	pWS4-YFP	Não houve mutante
	pWS4-CFP	Não houve mutante
	pWM1013	1,5 transformantes μg^{-1} de DNA
Ab-v6	pWM1013	0,25 transformantes μg^{-1} de DNA
RZ2MS16	pNKGFP	55 transformantes μg^{-1} de DNA

* A eficiência de transformação das linhagens SEMIA5079, SEMIA5080, Ab-v5 e Ab-v6 com os plasmídeos pSW4-YFP, pSW4-CFP e pWM13, foi mensurada pela razão entre número de transformantes por μg de DNA plasmidial.

Para a confirmação das identidades dos mutantes, realizou-se a extração do DNA e sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA. Foram escolhidos aleatoriamente, um entre os mutantes de SEMIA5080 e outro da linhagem Ab-v5, então denominados SEMIA5080:pWM1013 e Ab-v5:pWM1013 (dado não apresentado). Suas identidades foram

confirmadas como esperado, sendo esses mutantes utilizados para o experimento do monitoramento em plantas de soja e milho em casa de vegetação.

4.5 Análise do efeito da transformação com o plasmídeo pNKGFP no crescimento da linhagem RZ2MS16

Para observar o efeito da transformação no crescimento nas linhagens mutantes de RZ2MS16:pNKGFP foram realizadas, concomitantemente, curvas de crescimento da linhagem selvagem e das transformadas. Assim pôde-se observar um comportamento similar das mesmas, possibilitando a realização dos testes *in vivo* (Figura 5). Foi observado que a linhagem selvagem apresentou um pequeno aumento na velocidade de crescimento chegando à fase *log* mais rapidamente quando comparada com as linhagens mutantes. As linhagens mutantes, também apresentaram um retardamento na fase estacionária fatos que, no entanto, não afetam seu desempenho em geral.

Figura 5 - Curva de crescimento da RZ2MS16 e mutantes observada durante 26 horas de cultivo em meio LB à 28°C sob agitação constante de 150 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, medidas com um comprimento de onda de 600nm. As análises foram realizadas em triplicatas. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

4.6 Análise do efeito da transformação com o plasmídeo pWM1013 no crescimento da linhagem SEMIA5080

Para observar o efeito da transformação no crescimento da linhagem mutante SEMIA5080:pWM1013 foram realizadas, concomitantemente, curvas de crescimento da linhagem selvagem e da transformada. No caso desta linhagem, foi obtido apenas um transformante. A partir do gráfico resultante pôde-se observar um comportamento similar entre mesmas, possibilitando a realização dos testes *in vivo* (Figura 6). Foi observado que a

linhagem selvagem apresentou uma pequena diferença em relação a mutante entre a fase *log* e a estacionária às 10 e às 22 horas após a inoculação (h.a.i), onde a mutante cresceu mais vagarosamente, mas logo retomando a ter o crescimento igual à selvagem (24 h.a.i.).

Figura 6 - Curva de crescimento da SEMIA5080 e mutantes observada durante 30 horas de incubação em meio LM à 30°C sob agitação constante de 150 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm. As análises foram realizadas em triplicatas. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

4.7 Análise do efeito da transformação com o plasmídeo pWM1013 no crescimento da linhagem Ab-v5

Para observar o efeito da transformação no crescimento da linhagem mutante Ab-v5:pWM1013 foram realizadas, concomitantemente, curvas de crescimento da linhagem selvagem e das transformadas. No caso desta linhagem, foi obtido apenas um transformante. A partir do gráfico resultante pôde-se observar um comportamento similar entre mesmas, possibilitando a realização dos testes *in vivo* (Figura 7). Foi observado que a linhagem selvagem apresentou uma pequena diferença em relação a mutante na fase *log*, entre as 7 e as 9 h.a.i, onde a mutante cresceu mais vagarosamente, mas logo retomando a ter o crescimento igual à selvagem.

Figura 7 - Curva de crescimento da Ab-v5 e mutante observada durante 27 horas de incubação em meio DYGS à 35°C sob agitação constante de 150 rpm. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm. As análises foram realizadas em triplicatas. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

4.8 Teste de estabilidade da expressão das fluorescências

A linhagem Ab-v5:pWM1013 apresentou após 12 gerações, 100 % das colônias expressando o gene *dsRed*.. A partir das 24ª geração houve uma diminuição gradativa, chegando a 60,66% de colônias às 60 gerações, que possivelmente mantiveram o plasmídeo pWM1013. (Figura 8).

Figura 8 - Teste de estabilidade realizado no mutante de Ab-v5 transformado com o plasmídeo pWM1013, observando o comportamento das gerações no decorrer do tempo. As análises foram realizadas em triplicatas em meio DYGS sob agitação constante de 150 rpm à 35°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

Como esperado, por meio do teste de estabilidade foi observado que 100 % das colônias RZ2MS16:pNKGFP selecionadas mantiveram ativos os genes adquiridos na transformação (Figura 9), ou seja, por ser um plasmídeo integrativo, com o decorrer das gerações de multiplicação da bactéria, não se observou a perda dos genes.

Figura 9 - Teste de estabilidade realizado no mutante de RZ2MS16 transformado como plasmídeo pNKGFP, observando o comportamento das gerações no decorrer do tempo. As análises foram realizadas em triplicatas em meio LB com agitação constante de 150 rpm à 28°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

Já o mutante SEMIA5080:pWM1013, transformado com um plasmídeo replicativo, apresentou uma redução no número de células que permaceram com o plasmídeo ativo ao longo das gerações. Com 48 gerações, a porcentagem de colônias que mantiveram o plasmídeo foi 68,66%, e após 107 gerações, o número de colônias foi 31,33% (Figura 10).

Figura 10 - Teste de estabilidade realizado no mutante de SEMIA5080 transformado como plasmídeo pWM1013, observando o comportamento das gerações no decorrer do tempo. As análises foram realizadas em triplicatas em meio LM sob agitação constante de 150 rpm à 30°C. As barras mostram as médias $\pm$ do desvio padrão

4.9 Atividade sinérgica de RBPC e bioinoculantes na promoção de crescimento vegetal

4.9.1 Eficiência da RPCP e rizóbios quanto à promoção de crescimento em soja

Observou-se que para a variável altura da parte aérea (APA), o maior valor obtido foi de 36,05 cm, apresentado pelo tratamento T3 (RZ2MS16 + SEMIA5080), 28,01% maior que o controle não inoculado. Os tratamentos T2 (RZ2MS16 + SEMIA5079) e T8 (RZ2MS9. + SEMIA5080) não diferiram significativamente, entretanto, apresentaram um aumento significativo de 20,47% e 18,95%, respectivamente, em relação ao controle. Os tratamentos T1 (RZ2MS16) e T7 (RZ2MS9 + SEMIA5079) não apresentaram efeito estatisticamente significativo na promoção de crescimento em relação ao controle, entretanto, observou-se um aumento em relação ao controle de 13,7 % e 13%, respectivamente. Pode-se observar, ainda, que os tratamentos T4 (SEMIA5079), T5 (SEMIA5080) e T6 (RZ2MS9), não diferiram significativamente do controle (Figura 11).

Figura 11 - Médias das alturas, em centímetros, de 14 plantas de soja (APA), após 30 dias da germinação por tratamento: **T1-** RZ2MS16, **T2-** RZ2MS16 + SEMIA5079, **T3-** RZ2MS16 + SEMIA5080, **T4-** SEMIA5079, **T5-** SEMIA5080, **T6-** RZ2MS9, **T7-** RZ2MS9 + SEMIA5079, **T8-** RZ2MS9 + SEMIA5080, **T9-** Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Quanto ao parâmetro peso seco da parte aérea (PSPA) o tratamento T3 (RZ2MS16 + SEMIA5080) apresentou maior peso seco médio entre os tratamentos avaliados, e o único com diferença significativa, correspondendo a um aumento bastante expressivo de 98,30% em relação ao controle (Figura 12).

Figura 12 - Médias do peso seco da parte aérea, em gramas, de 14 plantas de soja (PSPA), após 30 dias da germinação por tratamento: **T1-** RZ2MS16, **T2-** RZ2MS16 + SEMIA5079, **T3-** RZ2MS16 + SEMIA5080, **T4-** SEMIA5079, **T5-** SEMIA5080, **T6-** RZ2MS9, **T7-** RZ2MS9 + SEMIA5079, **T8-** RZ2MS9 + SEMIA5080, **T9-** Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Já em relação aos valores obtidos quanto o peso seco do sistema radicular (PSSR) das plantas de soja avaliadas, observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Mas em números, mesmo sendo uma diferença mínima em relação ao controle, houve um aumento se comparado ao controle, dos tratamentos T3 (RZ2MS16 + SEMIA5080), T4 (SEMIA5079), T6 (RZ2MS9) e T7 (RZ2MS9 + SEMIA5079) (Figura 13).

Figura 13 - Médias do peso seco do sistema radicular, em gramas, de 14 plantas de soja (PSSR), após 30 dias da germinação por tratamento: **T1-** RZ2MS16, **T2-** RZ2MS16 + SEMIA5079, **T3-** RZ2MS16 + SEMIA5080, **T4-** SEMIA5079, **T5-** SEMIA5080, **T6-** RZ2MS9, **T7-** RZ2MS9 + SEMIA5079, **T8-** RZ2MS9 + SEMIA5080, **T9-** Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

No parâmetro avaliado, número de nódulos (NN) encontrados nas raízes das plantas de soja, verificou-se que não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos T2 (RZ2MS16 + SEMIA5079), T5 (SEMIA5080), T7 (RZ2MS9 + SEMIA5079) e T8 (RZ2MS9 + SEMIA5080) (Figura 14).

No entanto quando se compara os tratamentos T1 (RZ2MS16), T3 (RZ2MS16 + SEMIA5080), T4 (SEMIA5079) e T6 (RZ2MS9) estes tem uma redução de 81,79%, 50,66%, 35,89% e 54%, respectivamente, em relação ao controle.

Figura 14 - Médias do número de nódulos, em unidades, de 14 plantas de soja (NN), após 30 dias da germinação por tratamento: **T1**- RZ2MS16, **T2**- RZ2MS16 + SEMIA5079, **T3**- RZ2MS16 + SEMIA5080, **T4** - SEMIA5079, **T5**- SEMIA5080, **T6**- RZ2MS9, **T7**- RZ2MS9 + SEMIA5079, **T8**- RZ2MS9 + SEMIA5080, **T9**- Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Em relação ao último parâmetro avaliado, quanto à promoção de crescimento da soja sob efeito das inoculações com bactérias, o peso seco dos nódulos (PSN), não houve diferença significativa entre o tratamento T3 (RZ2MS16 + SEMIA5080), pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), para a variável PSN em relação ao controle. Por outro lado, observa-se que o tratamento T2 (RZ2MS16 + SEMIA5079) destaca-se significativamente perante os demais tratamentos com uma média de 0,0055 gramas de PSN, sendo 88,54% maior em relação ao controle (Figura 15). O T7 (RZ2MS9 + SEMIA5079) também merece destaque entre todos os tratamentos avaliados, atingindo 83,42% de PSN a mais que o controle.

Figura 15 - Médias do peso seco de nódulos, em gramas, de 14 plantas de soja (PSN), após 30 dias da germinação por tratamento: **T1-** RZ2MS16, **T2-** RZ2MS16 + SEMIA5079, **T3-** RZ2MS16 + SEMIA5080, **T4 -** SEMIA5079, **T5-** SEMIA5080, **T6-** RZ2MS9, **T7-** RZ2MS9 + SEMIA5079, **T8-** RZ2MS9 + SEMIA5080, **T9-** Controle. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

4.9.2 Eficiência de RPCP e *Azospirillum* sp. quanto à promoção de crescimento em milho

Apesar das variações observadas entre os tratamentos, não houve diferença significativa entre os mesmos, quando realizada a estatística dos dados pelo teste de Tukey, Duncan e teste T de Student ($p \leq 0,05$) em relação ao controle para todos os valores obtidos em todos os parâmetros analisados (Tabela 6).

Analisando o PSPA, observou-se que o melhor tratamento foi o T12 (RZ2MS16+Ab-v5, H2, +N), atingindo uma média entre as amostras de 1,827 g, 8,75% maior que o encontrado no controle. Para o DC, o tratamento que possuiu destaque foi o T2 (RZ2MS16+Ab-v5, H1, +N), com 8,538 cm, 10,23% melhor que o controle. No parâmetro NF, três tratamentos merecem destaque sob valor numérico, T1 (RZ2MS16, H1, +N), T2 (RZ2MS16+Ab-v5, H1, +N) e T12 (RZ2MS16+Ab-v5, H2, +N), ambos chegando a 5 folhas, em média, por planta analisada, todos com um valor de 9,4% a mais que o observado no controle. O maior valor obtido na AFS foi do tratamento T2 (RZ2MS16+Ab-v5, H1, +N), chegando a $0,699 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 5% maior que o encontrado no controle. O tratamento T18 (RZ2MS9, H2, -N) foi, em média dos valores numéricos, o mais expressivo entre todos os analisados para CR, APR, ASR e VR, com valores de 2125,18 cm, 82 cm², 254, 64 cm² e 2,49 cm³, sendo 7,99, 9,01, 9,01 e 9,78% maior que o controle, respectivamente. Em relação ao

DR, o T1 (RZ2MS16, H1, +N) obteve destaque perante os demais tratamentos, com 0,39 cm, 2,81% maior que o controle.

Tabela 6 - Parâmetros analisados em relação à promoção de crescimento em milho

Tratamento	Parâmetros avaliados*								
	PSPA (cm)	DC (cm)	NF (un)	AFS ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	CR (cm)	APR (cm ²)	ASR (cm ²)	DR (cm)	VR (cm ³)
RZ2MS16, H1, +H	1,719 $\pm$ 0,52	8,068 $\pm$ 1,59	5 $\pm$ 0	0,669 $\pm$ 0,06	2024,4 $\pm$ 783,69	77,39 $\pm$ 26,11	243,15 $\pm$ 82,04	0,391 $\pm$ 0,05	2,364 $\pm$ 0,82
RZ2MS16+Ab-v5, H1, +H	1,747 $\pm$ 0,4	8,538 $\pm$ 1,00	5 $\pm$ 0	0,699 $\pm$ 0,05	1744,9 $\pm$ 297,99	66,95 $\pm$ 11,79	210,35 $\pm$ 37,06	0,384 $\pm$ 0,02	2,027 $\pm$ 0,41
Ab-v5, H1, +H	1,642 $\pm$ 0,32	7,796 $\pm$ 1,22	4,8 $\pm$ 0,42	0,679 $\pm$ 0,1	1739,7 $\pm$ 337,61	65,17a $\pm$ 9,35	204,74 $\pm$ 29,38	0,378 $\pm$ 0,02	1,927 $\pm$ 0,24
Controle, H1, +H	1,518 $\pm$ 0,33	7,664 $\pm$ 1,04	4,7 $\pm$ 0,42	0,664 $\pm$ 0,06	1812,9a $\pm$ 570,76	69,00 $\pm$ 19,68	216,77 $\pm$ 61,84	0,38 $\pm$ 0,02	2,07 $\pm$ 0,56
RZ2MS16, H1, -H	1,405 $\pm$ 0,64	7,572 $\pm$ 1,12	4,8 $\pm$ 0,42	0,636 $\pm$ 0,13	2069,5 $\pm$ 665,52	78,39 $\pm$ 22,94	246,29 $\pm$ 72,09	0,387 $\pm$ 0,03	2,35 $\pm$ 0,66
RZ2MS16+Ab-v5, H1, -H	1,365 $\pm$ 0,39	7,737 $\pm$ 1,39	4,6 $\pm$ 0,63	0,636 $\pm$ 0,07	2069,5 $\pm$ 422,07	78,39 $\pm$ 16,79	246,29 $\pm$ 52,77	0,387 $\pm$ 0,02	2,35 $\pm$ 0,54
Ab-v5, H1, -H	1,588 $\pm$ 0,27	8,105 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 0,42	0,658 $\pm$ 0,1	1810,0 $\pm$ 547,13	65,26 $\pm$ 18,17	205,04 $\pm$ 57,09	0,364 $\pm$ 0,02	1,852 $\pm$ 0,49
RZ2MS9, H1, -H	1,536 $\pm$ 0,33	7,467 $\pm$ 0,94	4,8 $\pm$ 0,31	0,660 $\pm$ 0,06	1638,8 $\pm$ 771,60	61,84 $\pm$ 23,77	194,3 $\pm$ 74,68	0,377 $\pm$ 0,03	1,839 $\pm$ 0,58
RZ2MS9+Ab-v5, H1, -H	1,33 $\pm$ 0,4	7,367 $\pm$ 1,35	4,5 $\pm$ 0,42	0,609 $\pm$ 0,13	1665,1 $\pm$ 626,05	61,50 $\pm$ 20,49	193,23 $\pm$ 81,95	0,37 $\pm$ 0,01	1,792 $\pm$ 0,52
Controle, H1, -H	1,386 $\pm$ 0,49	7,895 $\pm$ 0,64	4,8 $\pm$ 0	0,661 $\pm$ 0,08	1702,0 $\pm$ 780,99	61,09 $\pm$ 29,05	191,93 $\pm$ 91,27	0,362 $\pm$ 0,02	1,732 $\pm$ 0,86
RZ2MS16, H2, +H	1,712 $\pm$ 0,27	8,237 $\pm$ 1,29	4,8 $\pm$ 0,42	0,679 $\pm$ 0,06	1824,2 $\pm$ 543,60	70,73 $\pm$ 20,14	222,21 $\pm$ 63,29	0,391 $\pm$ 0,02	2,158 $\pm$ 0,59
RZ2MS16+Ab-v5, H2, +H	1,827 $\pm$ 0,52	8,514 $\pm$ 1,82	5 $\pm$ 0,48	0,633 $\pm$ 0,09	2048,2 $\pm$ 605,63	79,33 $\pm$ 24,32	249,25 $\pm$ 76,4	0,39 $\pm$ 0,02	2,42 $\pm$ 0,78
Ab-v5, H2, +H	1,596 $\pm$ 0,34	8,212 $\pm$ 0,95	4,8 $\pm$ 0,31	0,668 $\pm$ 0,11	1638,2 $\pm$ 581,05	63,52 $\pm$ 19,39	199,55 $\pm$ 60,94	0,391 $\pm$ 0,01	1,94 $\pm$ 0,5
Controle, H2, +H	1,667 $\pm$ 0,37	7,917 $\pm$ 1,05	4,8 $\pm$ 0,63	0,665 $\pm$ 0,04	1714,9 $\pm$ 566,91	66,65 $\pm$ 21,28	209,39 $\pm$ 66,88	0,389 $\pm$ 0,01	2,036 $\pm$ 0,63
RZ2MS16, H2, -H	1,747 $\pm$ 0,45	8,076 $\pm$ 1,21	4,9 $\pm$ 0,42	0,639 $\pm$ 0,1	1915,5 $\pm$ 809,94	72,66 $\pm$ 28,95	228,29 $\pm$ 90,95	0,383 $\pm$ 0,02	2,169 $\pm$ 0,82
RZ2MS16+Ab-v5, H2, -H	1,572 $\pm$ 0,28	8,114 $\pm$ 1,20	4,8 $\pm$ 0,31	0,652 $\pm$ 0,07	2046,5 $\pm$ 450,28	78,52 $\pm$ 14,53	246,69 $\pm$ 45,67	0,386 $\pm$ 0,01	2,374 $\pm$ 0,37
Ab-v5, H2, -H	1,696 $\pm$ 0,49	8,148 $\pm$ 1,17	4,9a $\pm$ 0,69	0,639 $\pm$ 0,07	1915,5 $\pm$ 900,75	72,66 $\pm$ 31,18	228,29 $\pm$ 97,97	0,383 $\pm$ 0,02	2,169 $\pm$ 0,85
RZ2MS9, H2, -H	1,696 $\pm$ 0,5	8,372 $\pm$ 1,34	4,6 $\pm$ 0,51	0,664 $\pm$ 0,07	2125,1 $\pm$ 786,03	82,00 $\pm$ 30,12	257,64 $\pm$ 94,64	0,388 $\pm$ 0,02	2,494 $\pm$ 0,94
RZ2MS9+Ab-v5, H2, -H	1,48 $\pm$ 0,5	7,608 $\pm$ 1,48	4,9 $\pm$ 0,42	0,666 $\pm$ 0,13	1874,0 $\pm$ 747,52	67,91 $\pm$ 26,08	213,36 $\pm$ 81,95	0,365 $\pm$ 0,02	1,936 $\pm$ 0,72
Controle, H2, -H	1,69 $\pm$ 0,29	8,033 $\pm$ 1,18	4,8 $\pm$ 0,52	0,673 $\pm$ 0,07	1955,1 $\pm$ 515,67	74,61 $\pm$ 19,52	234,42 $\pm$ 61,34	0,386 $\pm$ 0,02	2,25 $\pm$ 0,61

*Médias de 10 plantas de milho para cada variável analisada (PSPA – Peso seco da parte aérea; DC – Diâmetro do caule; NF – Número de folhas; AFS – Análise Fotossintética; CR – Comprimento da raiz; APR – Área projetada da raiz; ASR – Área superficial da raiz; DR – Diâmetro da raiz; VR – Volume da raiz), após 60 DAE por tratamento. Os tratamentos foram: **T1**- RZ2MS16, H1, +N; **T2**-RZ2MS16+Ab-v5, H1, +N; **T3**- Ab-v5, H1, +N; **T4**- Controle, H1, +N; **T5**- RZ2MS16, H1, -N; **T6** - RZ2MS16+Ab-v5, H1, -N; **T7** – Ab-v5, H1, -N; **T8**- RZ2MS9 ,H1, -N; **T9** – RZ2MS9 + Ab-v5, H1, -N; **T10** – Controle, H1, -N; **T11**- RZ2MS16, H2, +N; **T12**- RZ2MS16+Ab-v5, H2, +N; **T13** – Ab-v5, H2, +N; **T14**- Controle, H2, +N; **T15**- RZ2MS16, H2, -N; **T16**- RZ2MS16+Ab-v5, H2, -N; **T17**- Ab-5, H2, -N; **T18**- RZ2MS9, H2, -N; **T19**- RZ2MS9 + Ab-v5, H2, -N e **T20**- Controle, H2, -N. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

4.10 Colonização das plantas pelas linhagens bacterianas modificadas

4.10.1 Colonização em plantas de soja pela RZ2MS16:pNKGFP e SEMIA5080:pWM1013

Quinze DAI poucas colônias de SEMIA5080:pWM1013 apresentando uma fluorescência vermelha foram encontradas em células do xilema da raiz de soja (como indicado na Figura 16A). Nesse mesmo período, foram observadas células de RZ2MS16:pNKGFP nas raízes (Figura 16B).

Em relação às folhas, 15 DAI foram observadas células de SEMIA5080:pWM1013 e de RZ2MS16:pNKGFP por microscopia ótica de fluorescência (Figura 16C e Figura 16D).

Interessantemente, não foram encontradas colônias fluorescentes nos tratamentos do consórcio e do controle em nenhum dos tecidos avaliados aos 15 DAI (dados não apresentados).

Figura 16 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens SEMIA5080:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP durante a interação com soja 15 DAI. (A) SEMIA5080:pWM1013 em raiz de soja; (B) RZ2MS16 em raiz de soja (C) SEMIA5080:pWM1013 em folha de soja (D) RZ2MS16 em folha de soja. Barras com 100 μ m de comprimento. Aumento de 40X (A e B) e 100X (C e D)

Como esperado, 30 DAI colônias de SEMIA5080:pWM1013 foram encontradas em maior quantidade colonizando células do xilema das raízes da soja, mas não foram encontradas em folhas neste período (Figura 17A e C). No mesmo período, não foram observadas colônias da linhagem RZ2MS16:pNKGFP nas raízes de soja (Figura 17B), entretanto células da linhagem RZ2MS16:pNKGFP foram observadas colonizando o mesófilo foliar (Figura 17D).

Não foram encontradas colônias com fluorescência nos tratamentos do consórcio e do controle em nenhum dos tecidos avaliados 30 DAI (dado não apresentado).

Figura 17 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens SEMIA5080:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP durante a interação com soja 30 DAI. (A) SEMIA5080:pWM1013 em raiz de soja; (B) RZ2MS16 em raiz de soja (C) SEMIA5080:pWM1013 em folha de soja (D) RZ2MS16 em folha de soja. Barras com 100 μ m de comprimento. Aumento de 40X (A e B) e 100X (C e D)

Por meio do reisolamento, 15 e 30 DAI, foi quantificada a presença das linhagens RZ2MS16:pNKGFP e SEMIA5080:pWM1013 na rizosfera, raiz, e parte aérea das plantas de soja (Figura 18).

Figura 18 - Esquema da colonização por RZ2MS16:pNKGFP e SEMIA5080:pWM1013 em plantas de soja na parte aérea, raiz e rizosfera 15 e 30 DAI

A linhagem RZ2MS16:pNKGFP quando inoculada separadamente, foi reisolada da rizosfera e da parte aérea das plantas de soja, tanto aos 15 como aos 30 DAI, sendo observado um aumento na densidade bacteriana presente na rizosfera da soja. No entanto, não foram reisoladas células de RZ2MS16:pNKGFP das raízes em ambos os tempos amostrados (Figura 19B).

Por meio do reisolamento da linhagem SEMIA5080:pWM1013 observou-se que a linhagem colonizou a rizosfera e a parte aérea das plantas de soja em ambos os tempos. Porém a maior densidade bacteriana foi observada nas raízes (Figura 19A), corroborando os dados obtidos por MOF.

No controle, como esperado, não foi detectada a presença de nenhuma das linhagens estudadas.

Figura 19 - Reisolamento das linhagens da rizosfera, raiz e parte aérea das plantas de soja após 15 e 30 dias da inoculação em plantas de soja. **A** – SEMIA5080:pWM1013 e **B** - RZ2MS16:pNKGFP. Os dados da média de 4 repetições da densidade bacteriana foi transformado em $\log_{10}(\text{UFC}+2) \text{ g}^{-1}$ para normalização. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

4.10.2 Colonização em plantas de milho pela RZ2MS16:pNKGFP e Ab-v5:pWM1013

Por MOF, foi observado que a linhagem Ab-v5:pWM1013 colonizou as células do parênquima cortical da raiz, bem como o mesófilo foliar, 15 DAI (Figura 20 A e C).

Nesse período, não foi observada a presença de células da linhagem RZ2MS16:pNKGFP nas raízes do milho a partir da microscopia de fluorescência (Figura 20B). Entretanto, células da linhagem RZ2MS16:pNKGFP, foram observadas no parênquima da bainha do feixe foliar (Figura 20D).

Não foram encontradas colônias do consórcio e do controle em nenhum dos tecidos avaliados aos 15 DAI (dados não apresentados).

Figura 20 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens Ab-v5:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP durante a interação com milho 15 dias após a inoculação . (A) Ab-v5:pWM1013 em raiz de milho; (B) RZ2MS16 em raiz de milho (C) Ab-v5:pWM1013 em folha de milho (D) RZ2MS16 em folha de milho. Barras com 100 μ m de comprimento. Aumento de 40X (A, B, C e D)

Já 30 DAI, foram observadas colônias de Ab-v5:pWM1013 nas raízes do milho, sendo localizadas nas células do parênquima cortical 30 DAI (Figura 21A). Colônias de RZ2MS16:pNKGFP não foram, novamente, encontradas nas células da raiz (Figura 21B). Já no consórcio, a linhagem Ab-v5:pWM1013 foi observada colonizando novamente o parênquima cortical das raízes (Figura 21C).

Quanto à colonização das bactérias transformadas na folha, houve um aumento de células da linhagem Ab-v5:pWM1013 30 DAI em relação aos 15 DAI. Trinta DAI as bactérias puderam ser detectadas sob luz UV em células do mesófilo foliar do milho (Figura 19D). O mesmo ocorreu para RZ2MS16:pNKGFP, onde se observou um aumento no número de colônias em relação aos 15 DAI, sendo encontradas colônias bacterianas no mesófilo foliar e também em células do parênquima da bainha do feixe (Figura 21E). No tratamento do

consórcio entre as bactérias Ab-v5:pWM1013 e RZ2MS16:pNKGFP, aos 30 DAI, as colônias das linhagens se mostraram distribuídas pelo mesófilo foliar (Figura 21F).

Não foram encontradas, como esperado, colônias das linhagens transformadas no controle aos 30 DAI (dado não apresentado).

Figura 21 - Monitoramento por microscopia de fluorescência ótica das linhagens Ab-v5:pWM1013, RZ2MS16:pNKGFP e consórcio durante a interação com milho 30 dias após a inoculação . (A) Ab-v5:pWM1013 em raiz de milho; (B) RZ2MS16 em raiz de milho (C) Consórcio das bactérias em raiz de milho (D) Ab-v5:pWM1013 em folha de milho (E) RZ2MS16 em folha de milho; (F) Consórcio das bactérias em folha de milho. Barras com 100 μ m de comprimento. Aumento de 40X (A, B e C) e 100X (D, E e F)

Similar à soja, por meio do reisolamento foi quantificada a densidade das linhagens RZ2MS16:pNKGFP e Ab-v5:pWM1013 quando inoculadas individualmente, 15 e 30 DAI (Figura 22).

Figura 22 - Esquema da colonização por RZ2MS16:pNKGFP e Ab-v5:pWM1013 em plantas de milho na parte aérea, raiz e rizosfera 15 e 30 DAI

A linhagem RZ2MS16:pNKGFP, apresentou aumento da densidade na rizosfera e raiz quando comparados os tempos (15 e 30 DAI), havendo uma redução da densidade da linhagem na folhas após 30 DAI (Figura 23A). Já a linhagem Ab-v5:pWM1013, demonstrou uma preferência na colonização da rizosfera de milho, aumentando sua densidade ao longo no tempo na raiz e reduzindo em contrapartida sua densidade nas folhas de milho quando comparados 15 e 30 DAI (Figura 23B).

Figura 23 - Reisolamento das linhagens da rizosfera, raiz e parte aérea das plantas de soja após 15 e 30 dias da inoculação em plantas de milho. **A** – RZ2MS16:pNKGFP e **B** – Ab-v5:pWM1013. Os dados da média de 4 repetições da densidade bacteriana foi transformado em $\log_{10}(\text{UFC}+2) \text{ g}^{-1}$ para normalização. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

5 DISCUSSÃO

Os principais instrumentos disponíveis para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos são os organismos e sua diversidade metabólica. As pesquisas e descobertas relacionadas à biotecnologia iniciam-se com a utilização de material biológico apropriado, a partir da procura de atributos desejáveis, a identificação e seleção dos melhores candidatos, tendo como objetivo principal o desenvolvimento de um produto ou processo desejável (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000). A microbiota do solo, por exemplo, compreende organismos adaptados a diferentes condições de temperatura, salinidade, condições nutricionais e hídricas, que por sua vez refletem em uma grande diversidade metabólica. Em função desta diversidade, da relativa facilidade de isolamento e cultivo em meios de baixo custo e da susceptibilidade para manipulação (genética ou ambiental), estes organismos podem ser explorados como fonte de processos de interesse para o ser humano (SHARMA et al, 2002; MÜLLER; HARMS; BLEY, 2010).

No presente trabalho foi avaliada a questão da promoção de crescimento das linhagens de *B. ambifaria*, *Bacillus* sp. e *A. brasilense* em plantas de milho; e de *B. ambifaria*, *Bacillus* sp. e *B. diazoefficiens* em plantas de soja, inoculadas isoladamente e/ou de forma conjunta. Foi também realizado o monitoramento de *B. ambifaria* e *A. brasilense* em plantas de milho, e *B. ambifaria* e *B. diazoefficiens* em soja, todas marcadas com genes de fluorescência.

Destaca-se que, atualmente alguns estudos têm demonstrado que a coinoculação ou inoculação mista, que consiste na utilização de combinações de diferentes microrganismos, onde estes produzem um efeito múltiplo, superando os resultados produtivos obtidos com os mesmos, isoladamente, podem promover incrementos no rendimento de culturas agrícolas quando utilizados conjuntamente (BÁRBARO et al., 2011). Mas poucos estudos visam entender como essas bactérias se comportam *in vivo* quando coinoculadas.

Guimarães et al. (2010) fizeram testes de inoculação em arroz com *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia seropedicae* com diversas dosagens de nitrogênio (0, 50 e 100 Kg.ha⁻¹) e observaram que mesmo não havendo diferença significativa entre as plantas inoculadas com *H. seropedicae* e o controle, para as três doses de fertilizante utilizadas, obteve-se incrementos de 12% na matéria seca. Por outro lado, as plantas inoculadas com *B. seropedicae* mostraram acúmulo de nitrogênio em torno de 12 % em relação ao controle. Quando adubadas com 50 kg nitrogênio ha⁻¹ e inoculadas com *H. seropedicae*, estas plantas apresentaram acúmulo de nitrogênio de 46 %. Resultados similares também foram obtidos

no presente trabalho, não havendo diferença estatística entre todos os tratamentos com 100% ou 30% da adubação nitrogenada para o desenvolvimento da cultura segundo recomendações agronômicas.

Embora não tenha sido verificada diferença estatística significativa entre as plantas inoculadas com a estirpe *H. seropedicae* e *Burkholderia sp.* em relação àquelas sem inoculação, foram obtidos aumentos de produção em torno de 21 % no tratamento inoculado (GUIMARÃES et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho, que para todos os parâmetros avaliados no milho (PSPA – Peso seco da parte aérea; DC – Diâmetro do caule; NF – Número de folhas; AFS – Análise Fotossintética; CR – Comprimento da raiz; APR – Área projetada da raiz; ASR – Área superficial da raiz; DR – Diâmetro da raiz; VR – Volume da raiz), não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas em valores numéricos, houve incremento entre 2,81 a 10,23% dos tratamentos inoculados em relação aos controles. Os melhores tratamentos para cada parâmetro foram: (RZ2MS16 + Ab-v5, H2, +N) para PSPA; (RZ2MS16 + Ab-v5, H1, +N) para DC; (RZ2MS16, H1, +N), (RZ2MS16 + Ab-v5, H1, +N) e (RZ2MS16 + Ab-v5, H2, +N) para NF; (RZ2MS16 + Ab-v5, H1, +N) para AFS e (RZ2MS9, H2, -N) para AFS CR, APR, ASR e VR. Sendo os melhores resultados, em valores numéricos, encontrados nos tratamentos com a adição da quantidade total de nitrogênio necessário à planta. Mas observa-se que o consórcio entre RZ2MS16 e Ab-v5 e a RZ2MS9 isolada podem auxiliar ainda mais no melhor desenvolvimento da planta. No entanto, para se ter um resultado mais concreto poderia ter sido observado diferença significativa entre tratamentos quanto à produção de grãos, se tivesse esperado o ciclo completo da cultura para avaliar.

Rhizobium etli quando coinoculado com *Bacillus subtilis* aumentou significativamente o número e o peso seco de nódulos, bem como o peso da matéria seca da raiz e parte aérea de plantas de feijoeiro (REMANS et al., 2007). Da mesma forma, a coinoculação entre *Rhizobium tropici* e *Bacillus sp.* aumentaram o número e o peso seco de nódulos, massa seca da raiz e da parte aérea de feijão. Mas quando coinoculadas com *Bradyrhizobium sp.* em soja, afetou negativamente o desenvolvimento da planta (CAMACHO et al., 2001). No presente estudo, a coinoculação em soja das linhagens de *Bacillus sp.* (RZ2MS9) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA5080) apresentou um incremento da altura de plantas, com diferença estatística em relação ao controle. A coinoculação entre *Bacillus sp.* (RZ2MS9) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA5079) aumentou o peso seco da raiz, número de nódulos e peso seco de nódulos em plantas de soja. Resultados positivos na soja também foram observados na coinoculação entre *B. ambifaria* (RZ2MS16) e

Bradyrhizobium diazoefficiens (SEMIA5080), observando aumento na altura, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz das plantas de soja em relação ao controle. E na coinoculação entre *B. ambifaria* (RZ2MS16) e *B. japonicum* (SEMIA5079) houve aumento da altura de plantas de soja, número de nódulos, e peso seco de nódulos em relação ao controle. Sendo os resultados mais expressivos encontrados na coinoculação entre *B. ambifaria* (RZ2MS16) e *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) quanto à promoção de crescimento em soja a partir dos parâmetros analisados. Esses dados sugerem que a coinoculação entre as rizobactérias (RZ2MS16 e RZ2MS9) e rizóbios (SEMIA5079 e SEMIA5080) realmente melhoram o desenvolvimento da soja perante os parâmetros aqui avaliados em relação à inoculação individual e ao controle, havendo um melhor resultado entre espécies coinoculadas de acordo com o parâmetro analisado. Aparentemente, o melhor tratamento foi encontrado com a coinoculação entre *B. ambifaria* (RZ2MS16) e *B. diazoefficiens* (SEMIA5080), sendo, por exemplo, observado um ganho real na massa seca das plantas analisadas. Entretanto, novos ensaios em campo devem ser realizados visando confirmar os resultados obtidos em casa de vegetação.

A transformação de bactérias com a inserção de plasmídeos contendo genes de fluorescência são de grande importância para o estudo das interações entre microrganismo planta, possibilitando a partir da transformação, monitorar os locais de colonização das bactérias nos tecidos vegetais a partir de cortes histológicos de plantas colocados sob luz UV. Na natureza, os plasmídeos são transferidos naturalmente pelo contato direto entre duas bactérias pelo processo de conjugação. Na engenharia genética foram criados métodos similares *in vitro* que auxiliam na transformação genética de bactérias e outros microrganismos (DIONISIO et al., 2005).

Dentre os métodos físicos mais comumente utilizados na técnica de DNA recombinante destacam-se a eletroporação, biobalística e o choque térmico. No método químico utiliza-se cloreto de cálcio paralelamente a técnica de choque térmico (TORTORA, 2012).

A eletroporação utiliza a ação da corrente elétrica de alta voltagem, sobre os componentes da membrana citoplasmática, polarizando a célula e gerando uma diferença de potencial. Quando este potencial ultrapassa um limiar de voltagem, ocorre micro rupturas (abertura dos poros) provisórias na membrana celular, promovendo um fluxo de íons e moléculas através das membranas, como exemplo, a entrada intracelular de um plasmídeo. A remoção do campo elétrico resulta no fechamento espontâneo dos poros bacterianos (FURLANETO, 2006). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para transformação de

bactérias associadas à plantas (LACAVA et al, 2004; GAI et al, 2009; QUECINE et al, 2012; DOURADO et al, 2013; SUN et al, 2014), sendo assim adotada no presente estudo.

Os plasmídeos devem possuir algumas características importantes: devem ser pequenos, de fácil manipulação e replicação, possuir genes que conferem resistência a um ou mais antibióticos para seleção das células transformadas, além de conter sítios de restrição localizados estrategicamente para a inserção do DNA de interesse (CALVETE; CASEIRO; SOUZA, 2015). O gene de resistência ao antibiótico ganha importância por ser um fator de seleção dos potenciais plasmídeos que podem ser utilizados para obtenção de mutantes.

A partir dessas premissas, antecedendo o processo de transformação, foram realizados testes para avaliar as resistências naturais os antibióticos por parte das linhagens a serem transformadas por meio da eletroporação, e assim escolher o plasmídeo contendo o gene de fluorescência mais interessante. A avaliação *in vitro* para demonstrar a sensibilidade ou resistência dos microrganismos a antibióticos são denominados antibiogramas (ROMEIRO, 2005). Os antibiogramas podem ser realizados em diversas técnicas, entre elas pode-se citar a bioeletroforese, difusão em gel, cromatografia em papel e disco de papel de filtro ocorrendo variação nas tangentes ao grau de sensibilidade (ROMEIRO, 2005). DE MORAES *et al.* (2014) realizaram testes *in vitro* a fim de analisar a resistência da bactéria *Burkholderia brasilensis* a 20 antibióticos, classificando como resistentes, intermediárias ou sensíveis de acordo com o diâmetro do halo de inibição formado. Para os antibióticos canamicina e tetraciclina, a bactéria *B. brasilensis* mostrou-se sensível, corroborando ao resultado obtido neste trabalho para *B. ambifaria* (RZ2MS16) e *A. brasilense* (Ab-v5) quando colocadas para crescer em meio com esses antibióticos. Sendo *B. diazoefficiens* (SEMIA5080) e *B. japonicum* (SEMIA5079) também sensíveis ao antibiótico Canamicina. Quanto aos antibióticos cloranfenicol e ampicilina, eles classificaram a bactéria *B. brasilensis* como resistente intermediária (DE MORAES et al., 2014). No presente trabalho, a linhagem de *B. ambifaria* (RZ2MS16) mostrou-se sensível ao cloranfenicol e resistente à ampicilina em experimentos realizados *in vitro*. A linhagem de *A. brasilense* (Ab-v5) se mostrou resistente ao cloranfenicol e à ampicilina. A resistência natural dos microrganismos a determinado antibiótico pode ser utilizada como um indicador de sobrevivência e competitividade, uma vez que muitos encontrados na rizosfera apresentam a capacidade de produzir estas substâncias (LEVY, 2006). Mesmo assim, nos ensaios de promoção de crescimento e monitoramento da colonização foram realizados com as linhagem Ab-v5 devido ao maior espectro de sensibilidade aos antibiótico testados (canamicina, ampicilina,

cloranfenicol e tetraciclina), bem como a escolha da SEMIA5080 (sensíveis a canamicina), visando a possível utilização de outras marcas de seleção em ensaios futuros e/ou reisolamento de bactérias consorciadas.

As transformações bacterianas foram realizadas a partir da eletroporação de células competentes de RZ2MS16, SEMIA5079, SEMIA5080, Ab-v5 e Ab-v6. É possível estimar a eficiência de transformação (número de colônias por micrograma de DNA utilizado na transformação) a partir da contagem de colônias. O teste mostra-se eficiente em resultados de UFC superiores a $1.10^6 \mu\text{g}^{-1}$ de DNA (CALVETE; CASEIRO; SOUZA, 2015). A partir deste cálculo, todas as bactérias transformadas com os plasmídeos pNKGFP (integrativo); pWM1013, pSW4-YFP e pWS4-CFP (replicativos) tiveram uma eficiência de transformação considerada baixa. Sendo que, neste trabalho, a RZ2MS16:pNKGFP foi a mais eficiente entre elas, obtendo $55 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA. As demais bactérias transformadas com plasmídios replicativos e suas respectivas eficiências foram SEMIA5079:pSW4-YFP com $6,2 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA; SEMIA5079:pSW4-CFP com $29 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA; SEMIA5079:pWM1013 com $1,5 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA; SEMIA5080:pSW4-YFP com $2,5 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA; SEMIA5080:pWM1013 com $0,5 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA; Ab-v5:pWM1013 com $1,5 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA e Ab-v6:pWM1013 com $2,5 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA. Resultado similar foi observado por Nonklang et al. (2008) que obtiveram na transformação de *K. marxyanus* uma eficiência de $90 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA para plasmídeo replicativo, e de $4,2.10^3 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA para plasmídeo integrativo, demonstrando que os plasmídeos integrativos possuem melhor eficiência de transformação quando comparado aos plasmídeos replicativos. No entanto, Fonseca et al. (2008) conseguiram transformantes de *K. marxyanus* com plasmídeo replicativo com eficiência na ordem de 10^2 e $10^3 \text{ UFC } \mu\text{g}^{-1}$ de DNA, bem acima das eficiências encontradas neste trabalho para o plasmídeo replicativo, demonstrando o quanto é controverso os resultados encontrados na literatura.

Em estudo para monitoramento de *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6) em *Cantharanthus roseus* transformado com o plasmídeo pCM88, Gai et al. (2009) obtiveram 10^2 transformantes por μL de DNA plasmidial, indicando uma eficiência de transformação elevada. Quanto à estabilidade da proteína no decorrer das gerações, observaram que a resistência à tetraciclina e a expressão do *gfp* foram mantidas, mas depois de 20 gerações em 120 horas, foram observadas 95 % das colônias expressando os genes inseridos, diminuindo 0,25 % da estabilidade a cada nova geração, aproximadamente. Corroborando com este resultado, no presente trabalho foi observado que a Ab-v5 e SEMIA5080 transformados com o plasmídeo replicativo (pWM1013), tiveram a manutenção do plasmídeo diminuída no

decorrer das gerações, chegando a 81,3% para Ab-v5:pWM1013 após 24 gerações e à 68,6% para SEMIA5080:pWM1013 após 12 gerações. Já o plasmídeo integrativo (pNKGFP) possuiu sua estabilidade inalterada (100%) no decorrer das gerações de multiplicação da RZ2MS16, como esperado.

As estirpes de *Rhizobium* podem sobreviver no solo por vários anos, sem estar associadas à planta hospedeira (BATTOMLEY, 1992). Segundo Triplett (1990) há um antagonismo entre bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* quanto ao estabelecimento das estirpes no solo e o processo de nodulação em plantas de soja. Tendo mais competitividade aqueles gêneros que colonizam naturalmente o local, sendo que vários fatores podem estar envolvidos neste antagonismo entre as linhagens de mesma espécie. Voss, Freire e Selbach (1984) inoculando as estirpes Car 04, Car 37 e Car 43, juntamente com Semia 487 e Semia 492, observaram que a estirpe Semia 487 ocorreu em mais de 80% dos nódulos, nos dois níveis de calcário testados, pH SMP 5,2 e pH SMP 6, mostrando que o efeito de níveis de calcário na capacidade de competição por sítio de nodulação variou com as estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Corroborando com este fato, no presente trabalho com estudos realizados *in vitro*, observou-se um antagonismo entre as linhagens de *Bradyrhizobium* SEMIA5079 e SEMIA5080, podendo estar envolvido também uma competição por nichos de colonização. Interessantemente, também foi observado neste estudo, um antagonismo entre cepas de *Azospirillum* (Ab-v5 e Ab-v6) *in vitro*.

Em seu trabalho, Jordan (1982) modificou a taxonomia quanto as classificações de rizóbios, dividindo-os em dois gêneros: *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. O primeiro gênero correspondia às cepas de crescimento lento, de reação básica. E o segundo cepas de crescimento rápido, de reação ácida em meio de cultura LMA (Levedura Manitol Ágar) (VINCENT, 1970). No presente trabalho, as linhagens identificadas como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* obtiveram, no entanto, velocidades de crescimento diferentes entre si. Sendo que a SEMIA5079 apresentou um crescimento mais demorado, e a SEMIA5080 um crescimento mais rápido, atingindo a fase log às 40 h.a.i e às 8 h.a.i, respectivamente. Desta forma, a segunda foi selecionada para ensaios de promoção de crescimento e monitoramento *in vivo*.

As bactérias do gênero *Azospirillum* podem ser encontradas na rizosfera de grama batatais, cana de açúcar, milho, arroz, sorgo (DOBEREINER, 1966) e alho (LEONCIO, 2015), como endófitos da parte aérea de cana de açúcar, arroz, milho e sorgo (BALDANI; DOBEREINER, 1980; VIANA, 2012) como também nas raízes de alho (LEONCIO, 2015) e milho (SANTOS et al., 2015). Apresentando resultado semelhante ao descrito pelos autores,

no presente trabalho a linhagem Ab-v5 pôde ser isolada da rizosfera, raiz, e parte aérea de plantas de milho. Mostrando sua versatilidade em relação aos locais de colonização bacteriana, além de assegurar sua caracterização como endófito.

Bactérias do gênero *Burkholderia* podem também ser encontradas em diversos nichos, na rizosfera de *Eucalyptus* (MASSENSINI et al., 2016) e guaranazeiro (BATISTA, 2013), nódulos de *Mimosa pudica* (BARRET; PARKERS, 2005), em raízes de trigo (MOREIRA, 2012), e parte aérea de arroz (VIANA, 2012). Com os dados obtidos no reisolamento deste trabalho, pôde-se observar que a linhagem RZ2MS16 coloniza rizosfera, raízes e parte aérea de plantas de milho. Sendo também observada em rizosfera e parte aérea de plantas de soja. Também podendo classificá-la, a partir destes dados, como endófito de milho e soja.

Quanto à *B. diazoefficiens* (SEMIA5080), a partir de resultados obtidos neste trabalho, pôde-se isolar a linhagem da rizosfera, raiz e parte aérea de plantas de soja. Bactérias deste gênero também podem ser isolados de diversas plantas e nichos, como na rizosfera de adesmia (MACHADO et al., 2015), em diferentes tipos de solos (LIMA; PEREIRA; MOREIRA, 2005), solo cultivado com soja (GIONGO, 2007), raiz de *Pterogyne nitens* (SANTOS; FERREIRA; SCORIZA, 2014), nódulos de *Mimosa pudica* (BARRET; PARKER, 2005), de feijão caupi (MARRA, 2009), de soja (GIONGO, 2007), de adesmia (MACHADO et al., 2015).

Surpreendentemente, há poucos estudos de interação entre RPCPs como as linhagens RZ2MS9 e RZ3MS16, e sua interação com outros bioinoculantes comerciais, visando o desenvolvimento de um produto tecnológico que promova o crescimento de uma vasta ampla de hospedeiro. Para as culturas de milho e soja, estudos têm sido direcionados para as bactérias fixadoras de crescimento. Entretanto, em gramíneas, o nitrogênio produzido pelos endófitos fixadores de nitrogênio é inadequado para o crescimento da planta (NISHIGUCHI et al., 2005). Asis et al. (2000) isolaram várias linhagens de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum*, sendo observado que apenas 40% dessas linhagens apresentaram redução de acetileno. Assim, a busca de consorcio bacteriano que acarrete em diversos benefícios à planta, como solubilização de fosfato, produção de AIA e sideróforos, seja interessante, abrindo enorme precedente para que estudos como o desenvolvido no presente trabalho sejam válidos.

Os dados obtidos com a marcação da RPCP RZ2MS16 e os bioinoculantes com genes de fluorescência, apesar de iniciais, são inéditos. Isso traz uma nova perspectiva no foco de estudo e compreensão da interação RPCP-planta e a real viabilidade de aplicação dessas bactérias como bioinoculantes na agricultura. Futuramente, genes de interesse podem ser

transferidos para as linhagens estudadas, a fim de aumentar os benéficos dessas linhagens. Além disso, pouco se sabe sobre os fatores envolvidos na interação bactéria-planta, pois a mesma sofre efeitos de muitas variáveis, tanto das plantas quando das bactérias, fato esse que corrobora a importância de futuros trabalhos, mais detalhados que avaliem os mecanismos de especificidade bactéria-planta hospedeira

Assim conclui-se que as linhagens RZ2MS16, Ab-v5 e SEMIA5080 são bactérias promotoras de crescimento e que podem ocupar os mais variados nichos relacionados às plantas de soja e milho, desde rizosféricas à endofíticas de raiz e parte aérea. Sendo também consideradas como promissores bioinoculantes, utilizadas adicionalmente com inoculantes de linhagens hoje já empregadas comercialmente em plantas de soja e milho. No entanto, estudos de campo poderiam ser realizados para comprovar de fato o efeito da coinoculação sobre a produtividade das culturas do milho e soja e também em outras culturas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, B.R.J.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 1-9, jul. 2003.
- ALVES, G.C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. 2007. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 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**, Santa Maria, v. 26, p. 241-248, jul. 2002.
- ANDRADE, A.C.; FONSECA, D.M.; QUEIROZ, D.S.; SALGADO, L.T.; CECON, P.R. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, ed. esp., p. 1643-1651, 2003.
- ANTOUN, H., BEAUCHAMP, C.J., GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on no-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, n. 1, p. 57-67, 1998.
- ARAÚJO, A.S.F.D.; CARNEIRO, R.F.V.; BEZERRA, A.A.C.; ARAÚJO, F.F.D. Co-inoculation rhizobia and *Bacillus subtilis* in cowpea and Leucaena: effects on nodulation, N₂ fixation and plant growth. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 182-185, 2010.
- ASGHAR, H.; ZAHIR, Z.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.
- BAIS, H.P.; PARK, S.W.; WEIR, T.L.; CALLAWAY, R.H.; VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 23-32, 2004.
- BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINEER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with 'Azospirillum' spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Seropédica, v. 12, p. 1-18, Aug.1980.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Seropédica, v. 29, p. 911-922, 1997.
- 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.
- BÁRBARO, I.M.; BRANCALIÃO, S.R.; TICELLI, M. **É possível fixação biológica de nitrogênio no milho**. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_2/fixacao/index.htm>. Acesso em: 04 jun. 2015.

- BÁRBARO, I.M.; JÚNIOR, L.S.B.; MACHADO, P.C.; MIGUEL, F.B. Resultados preliminares da co-inoculação de *Azospirillum brasilense* juntamente com *Bradyrhizobium* em soja. **Pesquisa & Tecnologia**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 5, 2011.
- BARRETT, C.F., PARKER, M.A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 28, n. 1, p. 57-65, 2005.
- BARRIUSO, J.; PEREYRA, M.T.; GARCÍA, J.L.; MEGÍAS, M.; MANERO, F.G.; RAMOS, B. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 82-89, 2005.
- BATISTA, B.D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactéria associada à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupuna* var. *sorbilis*)**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Querioz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 71p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- BEVININO, A; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, CANTALE, C.; S.; 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.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 64, p. 1644-1650, 2000.
- BLOEMBERG, G.V.; O'TOOLE, G.A.; LUGTENBERG, B.J.J.; KOLTER, R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Boston, v. 63, p. 4543-455, Nov. 1997.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 139-149, Aug. 2003.
- BOLAÑOS-JIMÉNEZ, F.; BORDAIS, A.; BEHRA, M.; STRÄHLE, U.; SAHEL, J.; RENDÓN, A. Dystrophin and Dp71, two products of the DMD gene, show a different pattern of expression during embryonic development in zebrafish. **Mechanisms of Development**, Strasbourg, v. 102, n. 1, p. 239-241, 2001.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, Calgary, v. 90, p. 45-47, 1989.
- BOTTOMLEY, P. J. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 293-348.

BRANDL, M.T.; MANDRELL, R.E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar thompson in the cilantro phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Albany, v. 68, n. 7, p. 3614-3621, July 2002.

BROWN, M.T.; ULGIATI, S. Emergy-based indices and ratios to evaluate sustainability: monitoring economies and technology toward environmentally sound innovation. **Ecological Engineering**, Gainesville, v. 9, p. 51-69, 1997.

BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Newcastle, v. 64, p. 573-606, 2000.

CALVETE, C.L., CASEIRO, M.M.; SOUZA, C.B. de. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, São Paulo v. 12, n. 26, p. 41-53, 2015.

CAMACHO, M.; SANTAMARIA, C.; TEMPRANO, F.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; DAZA, A. Co-inoculation with *Bacillus sp.* CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 1058-1062, 2001.

CAMPOS, I. M.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Santa Maria, v. 25, n. 3, p. 583-592, 2001.

CATTELAN, A.J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 199. 36 p. (Documentos, 139).

CAVALLET, L.H.; PESSOA, A.C. S.; HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R.; OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.

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

CHIARINI, L; BEVIVINO, A; TABACCHIONI, S; DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter sp.* on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, Rome, v. 30, p. 81-87, 1998.

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, v. 4, p. 238-245, 2002.

CODY, C.W; PRASHER, D.C; WESTLER, W.; PRENDERGAST, M.F.G.; WARD, W.W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemistry**, New Jersey, v. 32, n. 5, p. 1212-1218, 1993.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, London, v. 5, p. 719-729, 2003.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 1: safra 2013/14, sexto levantamento. Brasília, 2014.

COOK, R.J. Management of resident plant growth-promoting rhizobacteria with the cropping system: a review of experience in the US Pacific Northwest. **European Journal of Plant Pathology**, Pullman, v. 119, n. 3, p. 255-264, 2007.

DASHTI, N. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* L. Merr) under short season conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 200, p. 205-213, 1998.

DIONISIO, F.; CONCEICAO, I.C.; MARQUES, A.C.R.; FERNANDES, L.; GORDO, I. The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. **Biology Letters**, Oeiras, v. 1, n. 2, p. 250-252, 2005.

DÖBEREINER, J. 'Azobacter papali' sp.: uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de paspalum. **Revista de Pesquisa em Agropecuária**, Campo Grande, n. 1, p. 357-365. 1966.

DOURADO, M.N.; MARTINS, P.F.; QUECINE, M.C.; PIOTTO, F.A.; SOUZA, L.A.; FRANCO, M.R.; AZEVEDO, R.A. *Burkholderia* sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. **Annals of Applied Biology**, Campinas, v. 163, n. 3, p. 494-507, 2013.

ELLENBERG, J.; LIPPINCOTT, S.J.; PRESLEY, J.F. Dual-colour imaging with GFP variants. **Trends in Cell Biology**, Bethesda, v. 9, n. 2, p. 52-56. 1999.

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

FERLINI, H.A. **Co-inoculación en soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense***. 2006. Disponível em: <http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm>. Acesso em: 26 jul. 2014.

FERNANDEZ, L.A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M.A.; SAGARDOY M. A. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. **Biology and Fertility of Soils**. Berlin, v. 43, n. 6, p. 805-809. 2007.

FERREIRA, A.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L.; SHINITIRO, O.; ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, Piracicaba, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Delft, v. 79, n. 3, p. 339-354, 2008

FREITAS, J.R. de; 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, n. 4, p. 358-364, 1997.

FURLANETO, L. **Transformação genética de *Trypanosoma cruzi* mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. 2006. 87 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

GAGE, D.J.; BOBO, T.; LONG, S.R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfafa (*Medicago sativa*). *Journal of Bacteriology*, Berkeley, v. 178, n. 24, p. 7159-7166, 1996.

GAI, C.S.; LACAVA, P.T.; QUECINE, M.C.; AURIAC, M.C.; LOPES, J.R.S.; ARAUJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Transmission of *Methylobacterium mesophilicum* by *Bucephalagonia xanthophis* for paratransgenic control strategy of citrus variegated chlorosis. *The Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 448-454, 2009.

GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOSSEN, V.; ZUMELZU, G.; BABBITT, S.; KAHN, N. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, Berlin, v. 108, n. 5, p. 530-535, 2001.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 168 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

GIORDANO, S.R. Gestão ambiental no sistema agroindustrial. In: ZYLBERSZTAJN, D.; NEVES, M.F. **Economia e gestão dos negócios agroalimentares: indústria de alimentos, indústria de insumos, produção agropecuária, distribuição**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2005. p. 256.

GOMES, E.G.; MELLO, J.C.C.B.S.; MANGABEIRA, J.A.C. Estudo da sustentabilidade agrícola em município amazônico com análise envoltória de dados. **Pesquisa Operacional**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 23-42, 2009.

GRAY, E.J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.

GUIMARÃES, A.M.; PAZ, I.C.P.; SANTIN, R.D.C.M.; PAULI, G.; SILVA, M.E.; SOUZA, R.; SILVA, E. Utilização da rizobactéria *Bacillus amyloliquefaciens* na promoção de crescimento de alface (*Lactuca sativa* L.), em cultivo agroecológico. **Cadernos de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 1-6, 2013. Apresentado no In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 8., 2013, Porto Alegre.

GUIMARÃES, S.L.; CAMPOS, D.T.S.; BALDANI, V.L.D.; JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.

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

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, 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.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Haren, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HARPER, J. Nitrogen fixation-Limitations and Potential. In: WORLD SOYBEANS RESEARCH CONFERENCE, 6., 1999. Chicago. **Proceedings...** Chicago: Martinus Kijhoff Publishers, 1999. p. 235-243.

HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: a threat to human health? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 221-227, 1998.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: REUNIÃO BIENAL DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5., 1999, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária e de Extensão Rural de Santa Catarina, 1999. P. 1-3.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina, Brasil, Embrapa Soja. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). 2007.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and fertility of soils**, Londrina, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.S.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and a lipoferum improve yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 25-42.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento do Sistema de Produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2015. v. 29, n. 1, 83 p.

JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ontario, v. 32, p. 136–139, 1982.

KLOEPPER, J.W. A review of mechanisms for plant growth promotion by PGPR. In: INTERNATIONAL PGPR WORKSHOP, 6., p. 5-10. Calcutá, India. Outubro, 2003

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms. **Applied Soil Ecology**, Washington, v. 31, p. 91-100, 2006.

KRAVCHENKO, L.V.; MAKAROVA, N.M.; AZAROVA, T.S.; PROVOROV, N.A.; TIKHONOVICH, I.A. Isolation and phenotypic characterization of plant growth-promoting rhizobacteria with antiphytopathogenic activity and root-colonizing ability. **Microbiology**, St. Petersburg, v. 71, n. 4, p. 444-448, 2002.

KUKLINSKY-SOBRAL, J. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 174 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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, p. 1459-1465, 2007.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, casual agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 55-59, 2004.

LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1112-1120, 1996.

LAVIE, S.; STOTZKY, G. Adhesion of the clay minerals montmorillonite, kaolinite, and attapulgite reduces respiration of *Histoplasma capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 51, n. 1, p. 65-73, 1986.

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

LEONCIO, M.R. **Isolamento e caracterização de rizobacterias do alho (*Allium sativum*) e promoção de crescimento do milho (*Zea mays*)**. 2015. 32 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2015.

LEVY, S.B. Mechanisms for resistance in soil. **Science**, Boston, v. 312, n. 5773, p. 529, 2006.

LIBÓRIO, P.H.S.; TORNELI, I.M.B.; NÓBILE, F.O. de; GUERREIRO, R.D.; MIGUEL, F.B.; SILVA, J.A.A. da. Avaliação de híbridos de milho quanto a inoculação e adubação nitrogenada. **Ciência & Tecnologia**, Jaboticabal, v. 7, p. 5, 2015. Número especial.

LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R.; MOREIRA, F.D.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium spp.* de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

LIST OF PROKARIOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

MACHADO, R.G.; SÁ, E.L.S. de; DALLA COSTA, M.; DALAGNOL, G.L.; OLDRA, S.; SILVA, V. Isolamento, autenticação e seleção de rizóbios isolados de adesmia. **Tecnologia**, Santa Cruz do Sul, v. 20, n. 1, p. 14-19, 2015.

MASSENSINI, A.M.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C.; COSTA, M.D. Isolamento e caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de *Eucalyptus sp.* 1. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 40, n. 1, p. 125-134, 2016.

MAZZUCHELLI, R.C.L.; SOSSAI, B.F.; ARAÚJO, F.F. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrarie**, Presidente Prudente, v. 10, n. 2, p. 40-47, jul. 2014.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Piracicaba, v. 73, p. 7259-7267, 2007.

MORAIS, D.C.M. de, SILVA, C.R., SOUZA, C.E.R.; PAULA, F.D.M.S.F. Avaliação da resistência da bactéria burkholderia brasiliensis a antibióticos. **FOCO: Caderno de Estudos e Pesquisas**, Mogi Guaçu, n. 5, p. 77-88, 2014.

MOREIRA, F.S. **Isolamento e caracterização de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em regiões produtoras de trigo no Rio Grande do Sul**. 2012. 44 p. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. p.621 - 680.

MÜLLER, S.; HARMS, H.; BLEY, T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. **Current Opinion in Biotechnology**, Leipzig, v. 21, p. 100-113, 2010.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 29, p.889-895, 1997.

- NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B.M.; CHA-AIM, K.; MOONJAI, N.; HOSHIDA, H.; LIMTONG, S.; AKADA, R. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. **Applied and Environmental Microbiology**, Tokiwadai, v. 74, n. 24, p. 7514-7521, 2008.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 6, n. 7, p. 366-370, 1997.
- OLSEN, N.W.; MISAGHI, I.J. Plant growth promoting activity of heat-killed cells of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 1006, 1981.
- O'SULLIVAN, L.; MAHENTHIRALIGAM, E. Biotechnological potential withing the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, p. 8-11, 2005.
- PHILLIPS, D.A.; FERRIS, H.; COOK, D.R.; STRONG, D.R. Molecular control points in rhizosphere food webs. **Ecology**, Brookling, v. 84, p. 816-826, 2003.
- PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsi* in the greenhouse using endophytic *Bacillus sp.* **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 101, p. 665-672, 1995.
- QUADROS, P.D. **Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- 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*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 21, p. 7511-7518, Nov. 2012.
- RASOOL, L.; ASGHAR, M.; JAMIL, A.; REHMAN, S.U. Identification of *Azospirillum* species from wheat rhizosphere. **JAPS. Journal of Animal and Plant Sciences**, Faisalabad, v. 25, n. 4, p. 1081-1086, 2015.
- REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M. de; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2006. p. 153-174.
- REMANS, R.; CROONENBORGH, A.; GUTIERREZ, R.T.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 119, n. 3, p. 341-351, 2007.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp.* **Naturwissenschaften**, Havana, v. 91, p. 552-555, 2004.
- ROMEIRO, R.S. Antibióticos e seu emprego em pesquisa com bactérias fitopatogênicas. In: _____. (Ed.). **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 127-162.

_____. Perspectivas para políticas agroambientais. In: RAMOS, P. **Dimensões do agronegócio brasileiro: políticas, instituições e perspectivas**. Brasília: MDA, 2007. p. 283-312.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant and Microorganisms Interactions**, Cuernavaca, v. 8, p. 827-837, 2006.

SALLES, J.F. **Burkholderia community structure in soils under different agricultural management**. 2005. 144p. Thesis (Ph.D.) –Faculty of Mathematical & Natural Sciences, Institute of Evolutionary and Ecological Sciences, Leiden University, Leiden, 2005.

SAMBROOK, L.; FRITSCH, E.F.; MANITATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 2, 2344 p.

SANTOS, J.D.S.; VIANA, T.D.O.; JESUS, C.M.D.; BALDANI, V.L.D.; FERREIRA, J.S. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 78-85, 2015.

SANTOS, J.F. dos; SACRAMENTO, B.L. do; MOTA, K.N.A.B.; SOUZA, J.T. de; AZEVEDO NETO, A.D. de. Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 2, n. 1, p. 142-150, abr./jun. 2014.

SANTOS, R.S.; FERREIRA, J.S.; SCORIZA, R.N. Isolamento e caracterização de estirpes de rizóbio na espécie *Pterogyne nitens* Tull. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 8, n. 1, p. 71-76, 2014.

SASTALLA, I.; CHIM, K.; CHEUNG, G.Y.C.; POMERANTSEV, A.P.; LEPLA, S.H. Codon-optimized fluorescent proteins designed for expression in low-gc gram-positive bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Bathesda, v. 75, p. 2099–2110, 2009.

SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K.; GUPTA, J. K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. **Process Biochemistry**, Chandigarh, v. 37, p. 1075–1084, 2002.

SILVA, A.F.; CARVALHO, M.A.C.; SCHONINGER, E.L.; MONTEIRO, S.; CAIONE, G.; SANTOS, P.A. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 27, n. 3, p. 404-412, 2011.

SINGH, J.S.; PANDEY, V.C.; SINGH, D.P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Uttar Pradesh, v. 140, p. 339-353, 2011.

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 maio/ago. 2005.

SUN, K.; LIU, J.; GAO, Y.; JIN, L.; GU, Y.; WANG, W. Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-gfp. **Scientific Reports**, Nanjing, v. 4, p. 1-8 2014.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.

TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Madison, v. 3, n. 4, p. 199-206, 1990.

TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemichestry**, San Diego, v. 67, n. 1, p. 509-544, 1998.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Safra mundial de alimentos 2015/16: 9º levantamento do USDA. Washington, 2016. 12 p.

VAN, V.T.; 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.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: _____. (Ed.). **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina: EMBRAPA, 1997. p. 297-360.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, L.C.; CARVALHO, A.M. de; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 97-128.

VIANA, T.O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista-BA**. 2012. 96p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

VINCENT, J.M. **Manual for the pratical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwll, 1970. 164 p.

VOSS, M.; FREIRE, J.R.J.; SELBACH, P.A. Efeito de níveis de calcário no solo e na capacidade de competição de estirpes de *Rhizobium phaseoli* por sítio de nodulação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 4, p. 433-439, 1984.

WANG, K.; KANG, L.; ANAND, A.; LAZAROVITS, G.; MYSORE, K.S. Monitoring in plant bacterial infection at both cellular and whole plant levels using tre green fluorescence protein variant GFPuv. **New Phytology**, Oxford, v. 174, n. 1, p. 212-223, 2007.

WARD, W.W. Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: CHALFIE, M.; KAIN, S. (Ed.). **Green fluorescent protein: properties, applications and protocols**. New York: Wiley-Liss, 1998. p. 45–75.

WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O’GARA, F.; DOWLING, D.N.; BOESTEN, B. (Ed.). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. New York: VHC Publishers, 1994. chap. 1, p. 1-18.

YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C.M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, Daejeon, v. 14, p. 1-4, 2009.

YANG, T.T.; SINAI, P.; GREEN, G.; KITTS, P.A.; CHEN, Y.T.; LYBARGER, L.; CHERVENAK, R.; PATTERSON, G.H.; PISTON, D.W.; KAIN, S.R. Improved fluorescence and dual color detection with enhancer blue and green variants of the green fluorescent protein. **Journal of Biological Chemistry**, Tennessee, v. 273, p. 8212-8216, 1998.

ZHANG, W.T.; YANG, J.K.; YUAN, T.Y.; ZHOU, J.C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 44, p. 201-210, 2007.

ZILLI, J.É.; VALICHESKI, R.R.; RUMJANEK, N.G.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 811-818, 2006.