

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

**Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas às  
raízes de cana-de-açúcar**

**Danice Mazzer Luvizotto**

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

**Piracicaba  
2008**

Danice Mazzer Luvizotto  
Bióloga

**Caracterização Fisiológica e Molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar**

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

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

**Piracicaba  
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Luvizotto, Danice Mazzer

Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar / Danice Mazzer Luvizotto. - - Piracicaba, 2008.

94 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.  
Bibliografia.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio
2. Bactérias gram - negativas - técnicas moleculares
3. Cana-de-açúcar I. Título

CDD 633.61  
L976c

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

## **DEDICO**

Aos meus pais  
Osmar e Maria Inês,  
pelo amor, incentivo, apoio...

## **OFEREÇO**

Aos meus irmãos  
Daniela, Daniel e Danila,  
por estarem sempre ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, por iluminar todos os meus dias.
- À professora Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, minha orientadora, por me aceitar e confiar na minha capacidade de desenvolvimento deste trabalho.
- A Henrique Augusto Sbravatti, pela amizade, amor e carinho, principalmente pela compreensão.
- Aos professores João Lúcio de Azevedo e Welington Luiz de Araújo, e ao Doutor Paulo Teixeira Lacava, pela confiança, pela ajuda, e principalmente pelos exemplos como pesquisadores.
- À Dra. Joelma Marcon, pela amizade e toda sua imprescindível ajuda no desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Dr. Fernando Dini Andreote, por toda sua atenção e ajuda.
- À Maria Carolina Quecine, pela amizade e por todas suas dicas que me ajudaram a concretizar este trabalho.
- A Armando Dias, Carlos Ivan Aguilar (Carlão), Francisco Dini Andreote, José Antônio da Silva (Zezo), Laura Assumpção, Léia Cecília Favaro e Renata Assis, pela amizade, ajuda, enfim, por tudo.
- Ao CNPQ pela bolsa de estudos.
- Ao pessoal do Laboratório de Genética de Leveduras, Ana Maria B. Giacomell, Marina G. Alvez, e Luiz Humberto Gomes (Beto), pelo auxílio neste trabalho e principalmente pela amizade.
- A Giovana e Célia, secretárias da pós-graduação em Microbiologia Agrícola, por toda a ajuda e amizade.
- Aos meus pais, irmãos todos os meus amigos, que tiveram muita paciência durante estes mais de dois anos.
- Aos amigos do laboratório, Ademir Durrer, Aldo Procópio, Aline Romão (Romã), Alessandro Riffel, Anderson Ferreira, Ana Paula Pallu, Andrea Bogas, Camila Cunha, Cláudia Gai, Denise Moedin Balani, Fernanda Souza (Fer), Fernanda Bernardes, Manuela Nóbrega (Manu), Maria Beatriz Calderan (Bia), Maria Carolina Quecine (Carol), Mariele Porto Carneiro Leão, Marize Suzuki, Michelle Pereira e Silva, Priscila Rossetto (Pri), Rodrigo Mendes (Xico), Rodrigo Stuart,

Uirá Belmonte, Vanessa de Cássia, e Viviane Colombari, pela alegria, brincadeiras, pela compreensão, e pelas discussões essenciais para a elaboração deste trabalho.

- A todos os amigos do curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

- Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos, meus sinceros agradecimentos, pois tenho certeza de que sem a ajuda de todos este trabalho não seria concluído.

**Muito Obrigada!**

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

**Albert Einstein**





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão bibliográfica.....	21
2.1.1 A cana-de-açúcar.....	21
2.1.2 O gênero <i>Burkholderia</i> .....	22
2.1.3 Bactérias endofíticas associadas às plantas.....	24
2.1.4 Bactérias rizosféricas associadas às plantas.....	26
2.1.5 Bactérias como promotoras do crescimento vegetal.....	27
2.1.5.1 Bactérias fixadoras de nitrogênio.....	28
2.1.5.2 Bactérias produtoras de ácido-indol-acético (AIA).....	30
2.1.5.3 Bactérias produtoras de sideróforos.....	30
2.1.5.4 Bactérias solubilizadoras de fosfato.....	32
2.1.6 Produção enzimática.....	33
2.1.7 Controle de fitopatógenos por bactérias associadas às plantas.....	35
2.1.8 O uso de técnicas moleculares no estudo da variabilidade genética de bactérias.....	37
2.2 Material e métodos.....	39
2.2.1 Isolados bacterianos.....	39
2.2.2 Caracterização baseada no fenótipo.....	41
2.2.2.1 Produção de enzimas.....	41
2.2.2.2 Características relacionadas com a promoção de crescimento vegetal.....	42
2.2.2.2.1 Fixação de nitrogênio.....	42
2.2.2.2.2 Produção de ácido-indol-acético (AIA).....	43
2.2.2.2.3 Produção de sideróforos.....	43
2.2.2.2.4 Solubilização de fosfato inorgânico.....	43

2.2.2.3 Ensaio de antagonismo, <i>in vitro</i> , contra patógenos de cana-de-açúcar.....	44
2.2.2.3.1 Ensaio de antagonismo, <i>in vitro</i> , contra <i>Fusarium verticillioides</i> (Método da cultura pareada).....	44
2.2.2.3.2 Ensaio de antagonismo, <i>in vitro</i> , contra <i>Xanthomonas albilineans</i> (Produção de substâncias inibitórias do tipo bacteriocina – SITB).....	44
2.2.3 Caracterização baseada no genótipo.....	45
2.2.3.1 Extração de DNA genômico bacteriano.....	45
2.2.3.2 Caracterização da diversidade genômica.....	45
2.2.3.2.1 Amplificação e análise por BOX-PCR.....	45
2.2.3.3 Caracterização genética.....	46
2.2.3.3.1 Gene 16S rDNA.....	46
2.2.3.3.1.1 Amplificação do gene 16S rDNA.....	46
2.2.3.3.1.2 Análise por ARDRA.....	46
2.2.3.3.1.3 Seqüenciamento e análise do gene 16S rDNA.....	47
2.2.3.3.2 Gene gyrase ( <i>gyrB</i> ).....	47
2.2.3.3.2.1 Amplificação do gene que codifica para DNA gyrase subunidade B ( <i>gyrB</i> ).....	47
2.2.3.3.2.2 Seqüenciamento e análise do gene gyrase ( <i>gyrB</i> ).....	48
2.2.4 Análises estatísticas.....	48
2.2.4.1 Caracterização baseada em fenótipo.....	48
2.3 Resultados.....	49
2.3.1 Caracterização baseada no fenótipo.....	49
2.3.2 Caracterização baseada no genótipo.....	54
2.4 Discussão.....	62
3 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	73

## RESUMO

### **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma planta que ocupa posição de destaque entre as culturas de importância econômica no cenário internacional, principalmente no Brasil, que é o maior produtor mundial. O estudo da diversidade microbiana associada a plantas, principalmente aquelas com interesse comercial, apresenta-se como importante alternativa para melhorar as características e a sustentabilidade destas culturas. Neste sentido, bactérias endofíticas e rizobactérias tem sido alvo de muitos estudos, pois apresentam efeitos benéficos para as plantas, como promoção de crescimento e inibição de patógenos. Um dos grupos de bactérias que colonizam a cana-de-açúcar é composto por espécies do gênero *Burkholderia*. Este gênero é composto de bactérias que podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, como o solo, a água, ou em associação com plantas, fungos, e outros animais, além de humanos. Na interação bactéria-planta, as espécies de *Burkholderia* podem colonizar a rizosfera e o interior das raízes hospedeiro, onde podem estimular o crescimento do vegetal, contribuir para sua nutrição, como também protegê-lo da ação de fitopatógenos. Sendo assim, isolados de *Burkholderia* spp. do interior das raízes (endofíticos) e da rizosfera de cana-de-açúcar foram avaliados quanto à capacidade de fixar nitrogênio, produzir AIA, sideróforos, enzimas de interesse biotecnológico, solubilizar fosfato inorgânico e inibir patógenos desta cultura. Estes isolados também foram caracterizados geneticamente por análise de restrição e seqüenciamento dos genes 16S rDNA e *gyrB*, além da caracterização genotípica por BOX-PCR. Os resultados indicam que os isolados possuem potencial para promoção de crescimento vegetal, inibição de patógenos e produção de lipases. Filogeneticamente, a maioria dos isolados pertencem ao complexo *Burkholderia cepacia* com similaridade à *B. cepacia* e *B. cenocepacia*. Considerando a ocorrência dos isolados como endófitos ou rizosféricos, as metodologias fenotípicas e genotípicas não foram capazes de distinguir os membros componentes destas comunidades. Este trabalho evidencia a ampla associação deste grupo com cana-de-açúcar, e destaca as possíveis aplicações que tais bactérias podem ter no cultivo e sustentabilidade desta cultura.

Palavras-chave: Avaliação fisiológica; Cana-de-açúcar; *Burkholderia* spp.; Técnicas moleculares



## ABSTRACT

### **Molecular and physiological characterization of *Burkholderia* spp. associated with the sugarcane root**

Sugarcane (*Saccharum* spp.) occupies a position of prominence among the economically important crops in the international scene, mainly in Brazil, which is the world's largest producer. The study of microbial diversity associated with plants, especially those with commercial interest, presents itself an important alternative to improve the performance and sustainability of these crops. In this sense, endophytic bacteria and rhizobacteria has been target of many studies, since they have beneficial effects for plants, such as plant growth promotion and inhibition of pathogens. One of the bacterial groups that colonize sugarcane is composed of species of the genus *Burkholderia*. This genus is composed of a bacterium that can be found in different ecological niches, such as soil, water, or in association with plants, fungi and other animals, as well as in humans. In the association bacterium-plant, the species of *Burkholderia* can colonize the rhizosphere and the inside of the host roots, which can stimulate the growth of the plant, contributing to its nutrition, but also protects it from the action of phytopathogens. Thus strains of *Burkholderia* spp. isolated from the inside of the roots (endophytic) and from the rhizosphere of sugarcane were evaluated for the ability to fix nitrogen, produce IAA, siderophores, enzymes of biotechnological interests, solubilize inorganic phosphate and inhibits pathogens of the same crop. These strains were also genetically characterized by the analysis of enzymatic restriction and sequencing of 16S rDNA and *gyrB* genes, in addition to the characterization by genotypic technique BOX-PCR. The results indicate that the strains have potential for plant growth promotion, inhibition of pathogens and production of lipases. Phylogenetically, the isolates were affiliated to *Burkholderia cepacia* complex, with mainly similarity to *B. cepacia* and *B. cenocepacia*. Considering the occurrence of isolated as endophytes or rhizosphere, the genotypic and phenotypic methods were not able to distinguish the members of these communities. This research work demonstrates the broad association that this group has with sugarcane, and highlights the possible applications that these bacteria may have in cultivation and sustainability of this crop.

Keywords: *Burkholderia* spp.; Molecular techniques; Physiological assessment; Sugarcane



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Testes de fixação de nitrogênio realizados em meio de cultura NFb.....	52
Figura 2 -	Testes de produção de sideróforos realizados em meio de cultura CAS Ágar.....	52
Figura 3 -	Ensaio de antagonismo, <i>in vitro</i> , contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....	53
Figura 4 -	Ensaio de antagonismo, <i>in vitro</i> , contra <i>X. albilineans</i> pelo método da sobre camada de ágar (SITB).....	53
Figura 5 -	Correlação dos isolados com base nos perfis de BOX-PCR. Os perfis genéticos gerados foram analisados e agrupados com o programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica), o agrupamento foi realizado por correlação de Jaccard das curvas densitométricas dos isolados.....	55
Figura 6 -	Árvore filogenética baseada na comparação das seqüências do gene 16S rDNA dos isolados com as seqüências disponíveis no banco de dados. Os agrupamentos foram calculados com o método de <i>Máxima Parcimônia</i> (MP).....	57
Figura 7 -	Árvore filogenética baseada na comparação das seqüências do gene <i>gyrB</i> dos isolados com as seqüências disponíveis no banco de dados. O agrupamento calculado com o método de <i>Máxima Parcimônia</i> (MP).....	61





**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Origem (local de isolamento), código de estoque, variedade da cana-de-açúcar e tratamento a qual as plantas foram submetidas antes da obtenção dos isolados utilizados neste trabalho.....	40
Tabela 2 -	Índices enzimáticos obtidos para as atividades de esterase e lipase, produção de AIA e solubilização de fosfato, avaliados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	50
Tabela 3 -	Dados do seqüenciamento parcial dos genes 16S rDNA e <i>gyrB</i> , com identificação por similaridade realizada com o programa BLASTn contra a base de dados nt/nr do banco de dados.....	58



## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma planta que ocupa posição de destaque entre as culturas de importância econômica no cenário nacional e internacional. O Brasil é o maior produtor mundial, com uma safra estimada para 2007/08 de 475,07 milhões de toneladas, sendo esta produção destinada, principalmente, à fabricação de açúcar e álcool. Esta produção é resultado de um aumento de 10,62% (45,60 milhões de toneladas) em relação à safra de 2006/07.

Devido à importância desta cultura, o Brasil tem investido cada vez mais no desenvolvimento de novas variedades, obtidas por melhoramento convencional ou transgenia, introduzindo características como resistência a insetos e herbicidas, maior teor de açúcar, ausência de florescimento, entre outras.

Além da manipulação genética destas plantas, o estudo da diversidade microbiana associada apresenta-se como importante alternativa para melhorar as características da planta e a sustentabilidade desta cultura. Estudos sobre a comunidade endofítica de cana-de-açúcar demonstram que os gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* podem participar da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, o que pode gerar um aumento de produção sem elevar custos e a aplicação de insumos como adubos nitrogenados. Os microrganismos endofíticos podem ainda produzir sideróforos e fornecer cátions de ferro presentes no solo para a planta, ou produzir hormônios e/ou solubilizar minerais assim como o fosfato. Esta gama de mecanismos faz destes microrganismos importantes promotores do crescimento vegetal.

Dentro deste contexto, o gênero *Burkholderia* vem sendo bastante estudado quanto a estas características benéficas para as plantas, e no caso da cana-de-açúcar, bactérias pertencentes a este gênero estão presentes tanto na rizosfera quanto como endófitos. Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia*, endofíticas de raiz e da rizosfera de cana-de-açúcar, buscando investigar se existem diferenças entre estas comunidades, de acordo com o seu local de origem, bem como avaliar suas características relacionadas à promoção de crescimento vegetal e a capacidade das mesmas em inibir o crescimento de patógenos de cana-de-açúcar.



## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão bibliográfica**

#### **2.1.1 A cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do mundo, sendo cultivada principalmente nas regiões tropicais do globo. Esta cultura engloba um total de 30 espécies que pertencem ao gênero *Saccharum* (EMBRAPA, 2008). O Brasil é atualmente o maior produtor mundial desta cultura, apresentando uma área de 7 milhões de hectares, a qual corresponde a 2% de toda terra agriculturável do país. As regiões de cultivo são: Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste, permitindo duas safras por ano. Portanto, durante todo o ano o Brasil produz açúcar e etanol para os mercados interno e externo (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - ÚNICA, 2008), fato que permite ao país influência considerável sobre o mercado internacional de açúcar (GOLDEMBERG, 2006).

Uma estimativa divulgada em abril de 2008 pela União da Indústria de Cana-de-açúcar demonstrou que a safra de cana-de-açúcar 2008/2009 deverá ser a maior da história, com 498,1 milhões de toneladas colhidas. Segundo esta projeção da entidade, a safra que se iniciou no mês de abril será 16% maior do que a anterior, quando foram colhidas 431,2 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Nesta safra, a produção de açúcar deve ser 9% maior do que o resultado obtido no ano anterior e deverá chegar a 28,6 milhões de toneladas do produto, com aumento também na produção total de álcool, que deverá ter um crescimento de 19%, com um total de 24,3 bilhões de litros (ÚNICA, 2008).

O cultivo da cana-de-açúcar começou no Brasil em 1522 (BASTOS, 1987), porém, a cultura da cana somente passou a ser incentivada pelo governo federal a partir de 1970, quando se iniciou a busca para solucionar a crise energética emergente, visando na cana-de-açúcar a potencialidade como fonte de energia renovável (BARELA, 2005). Desta maneira, o aumento do consumo doméstico fez com que o álcool ganhasse destaque no segmento agroindustrial brasileiro, em consequência do preço competitivo do combustível em relação à gasolina. O álcool é um combustível barato, renovável e cujo emprego como alternativa para a matriz energética mundial está em fase de crescimento. A tendência de aumento da produção de álcool no Brasil

ocorre principalmente por causa do aumento da frota de carros bi-combustível (demanda interna), atendimento ao Protocolo de Kyoto (demanda externa) e aumento do preço do petróleo (MACEDO, 2007; INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA, 2008).

No entanto, esta cultura apresenta dificuldades a serem superadas, para conseguir uma produção com menor custo e de forma sustentável. Um dos principais problemas na cultura da cana-de-açúcar é a presença de plantas daninhas, que interferem no processo produtivo competindo pelos recursos do meio (água, luz e nutrientes), atuando como hospedeiras de pragas, doenças e nematóides comuns à cultura, ou interferindo na colheita, levando a um aumento nos custos da produção desta cultura (PITELLI, 1985).

O equilíbrio entre a sustentabilidade e produtividade da cana acontece por meio de novas variedades de plantas com tolerância a herbicidas e/ou adaptáveis às condições de cada região. Nesse aspecto, o Brasil está numa posição privilegiada e se coloca na vanguarda mundial da biotecnologia de cana, possuindo inclusive, variedades transgênicas (ainda não comerciais) desde meados de 1990 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2008). Assim, a sustentabilidade da produção agrícola da cana-de-açúcar no Brasil está fundamentada na capacidade de responder a pragas, doenças e variações climáticas, o que tem sido possível com o suprimento contínuo de variedades resistentes (MACEDO, 2007).

### **2.1.2 O gênero *Burkholderia***

O gênero *Burkholderia* foi sugerido por Yabuuchi et al. (1992), que propôs este gênero para incluir o grupo II em homologia do rRNA de *Pseudomonas*, com *Burkholderia cepacia* (antiga *Pseudomonas cepacia*) como espécie padrão (PALLERONI, 1997). Esta classificação foi baseada na composição celular, no seqüenciamento da região 16S rDNA, na homologia do DNA-DNA e em características fenotípicas (YABUUCHI et al., 1992). O nome deste gênero provém do pesquisador Burkholder, que foi quem observou esta espécie padrão (antiga *Pseudomonas cepacia*) e a descreveu como sendo o agente causal da podridão mole da cebola (BURKHOLDER, 1950).

Este gênero é formado por bactérias Gram-negativas pertencentes ao filo das Proteobactérias e a classe das Betaproteobactéria (HOLMES et al., 1998). Atualmente, este gênero inclui mais de 30

espécies que são encontradas em vários nichos ecológicos, mas principalmente no solo e rizosfera (COENYE; VANDAMME, 2003). Nestes ambientes as mais recentes espécies descritas foram nomeadas como *Burkholderia sacchari* (BRAMER et al., 2001), *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004) e *Burkholderia unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004). Neste grupo extremamente versátil, certas espécies são capazes de causar doenças em plantas e no homem, enquanto outras são tipicamente usadas como agentes de biocontrole, e outras ainda são capazes de remediar áreas poluídas. No homem, algumas espécies atuam como patógenos oportunistas em pacientes com fibrose cística (DARLING et al., 1998; COENYE; VANDAMME, 2003).

Apesar disso, certas espécies de *Burkholderia* têm demonstrado ser muito eficientes no controle biológico, na biorremediação, e na promoção de crescimento vegetal (COENYE; VANDAMME, 2003; O'SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005). Tais espécies têm, entre outras propriedades, a capacidade de solubilizar fosfato, podendo dessa forma ser utilizadas como biofertilizantes (PURNOMO et al., 2005; ARTURSSON et al., 2006). Esta potencialidade na disponibilização de nutrientes está relacionada à versatilidade nutricional deste gênero, que permite a estas bactérias crescer em mais de duzentos compostos orgânicos (COENYE; VANDAMME, 2003). Dentre estes compostos, estão fontes de carbono incomuns, como ácido azelaico e triptofano (BURBAGE; SASSER, 1982). Esta capacidade nutricional contribui na habilidade destas bactérias em competir com sucesso por exsudados da planta, o que facilita a colonização das raízes (DALMASTRI et al., 1999). Tal versatilidade também confere a este grupo a habilidade de ser usado em processo de biodegradação ambiental de poluentes (van PELT et al., 1999). Muitas espécies pertencentes a este gênero possuem habilidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001), o que faz com que possam também ser utilizadas como biopesticidas (van PELT et al., 1999).

Este gênero vem recebendo bastante atenção nos estudos envolvendo fixação de nitrogênio, já que algumas espécies vêm sendo descritas como bactérias diazotróficas endofíticas (YABUUCHI et al., 1992). No que se diz respeito às bactérias deste gênero habitantes da rizosfera, estudos têm demonstrado que algumas são capazes de fixar nitrogênio, crescer em uma ampla faixa de temperatura, produzir ácido-indol-acético e sideróforos, além de apresentar atividade antagônica contra vários fungos fitopatogênicos como *Fusarium* e *Rhizoctonia* (BEVIVINO et al., 1998).

Vandamme et al. (1997) demonstraram que os diversos isolados da “espécie” padrão do gênero, *B. cepacia*, possuíam um pequeno grau de hibridização de DNA-DNA, muitas vezes abaixo de 30%. Assim, ficou estabelecido que isolados inicialmente classificados como uma única espécie, poderiam pertencer à espécies filogeneticamente distintas, mas com grande semelhança fenotípica. Neste sentido, diversos estudos têm sido realizados, e criou-se a expressão “complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC). Este complexo se divide em espécies distintas, nomeados como o termo genomovar (variante genômica). Atualmente, após vários estudos taxonômicos, são descritas nove espécies: *B. cepacia* (variante genômica I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* (III), *B. stabilis* (IV), *B. vietnamiensis* (V), *B. dolosa* (VI), *B. ambifaria* (VII), *B. anthina* (VIII), e *B. pyrrocinia* (IX). Estas espécies possuem moderados níveis de hibridização DNA-DNA (30 a 50%) e alta similaridade dos genes 16S rRNA (98 a 99%) e *recA* (94 a 95%) (COENYE; VANDAMME, 2003; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; RAMETTE; LIPUMA; TIEDJE, 2005).

Dessa forma, o gênero *Burkholderia* é um grupo bacteriano intrigante, de grande importância em vários ecossistemas, devido à sua habilidade em degradar poluentes, produzir compostos antimicrobianos, promover o crescimento vegetal, fixar nitrogênio atmosférico e ocupar uma grande variedade de nichos ecológicos (SALLES, 2005).

### **2.1.3 Bactérias endofíticas associadas às plantas**

As plantas podem ser consideradas um micro ecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de bactérias (AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI, 2000). As bactérias que estão em relação íntima com as plantas são denominadas endofíticas. O termo ‘Endófito’ (Endophyte) tem origem Grega, onde ‘endon’ significa ‘de dentro’ e ‘phyte’ significa ‘planta’ (CARROLL, 1988).

De acordo com Azevedo e Araújo (2003), endófitos são microrganismos isolados do interior dos tecidos ou órgãos vegetais saudáveis, onde vivem durante todo ou parte do seu ciclo de vida, sem causar doenças ou estruturas externas visíveis. Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição do termo ‘microrganismo endofítico’, considerando as definições anteriores, e dividindo endófitos em dois tipos, sendo: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à



planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. É importante ressaltar que a classificação em microrganismos endofíticos dos Tipos I e II, microrganismos epifíticos ou patógenos tem uma função meramente didática.

Considerando que existem aproximadas 300.000 espécies de plantas, e cada uma delas é hospedeira de um ou mais grupo de microrganismos endofíticos, existem então bilhões de endófitos relacionados a diferentes culturas (STROBEL et al., 2004). As bactérias endofíticas podem colonizar um nicho ecológico similar ao de patógenos, o que as torna adequadas para serem usadas como agentes de biocontrole (BERG et al., 2005), neste contexto, existem numerosos relatos mostrando a utilização de microrganismos endofíticos no controle de fitopatógenos (STURZ; MATHESON, 1996; CHANWAY, 1998; JAMES, 2000; AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI, 2000; LODEWYCKX et al., 2002).

A origem, a maneira de penetração, a transmissão e a colonização de tecidos vegetais por bactérias endofíticas ainda gera grande discussão. Estas bactérias podem ser provenientes de sementes, do filoplano, da rizosfera e de material propagado vegetativamente. (HALLMANN et al., 1997b; McLONROY; KLOPPER, 1995a; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998). Os microrganismos endofíticos estão presentes na parte aérea, no caule e nas raízes das plantas, sendo estas as principais portas de entradas dos mesmos (ANDREOTE et al., 2006; AZEVEDO, 1998).

Segundo Misaghi e Donndelinger (1990), através de processos co-evolutivos as bactérias endofíticas conseguiram manter uma relação bastante íntima com seu hospedeiro. Estas bactérias possuem também a habilidade de se manter dentro dos tecidos vegetais isentos da competição microbiana, o que é uma vantagem ecológica a qual pode ser atribuída à alta capacidade de aproveitamento destes microrganismos nas aplicações biotecnológicas.

Várias são as razões que despertam o interesse no potencial biotecnológico das bactérias endofíticas, tais como: íntima associação com a planta hospedeira, fixação de nitrogênio, indução de resistência à condição de estresse, mudanças nas condições fisiológicas da planta, produção de enzimas e drogas de interesse farmacológico e produção de reguladores de crescimento vegetal. Assim, os estudos com microrganismos endofíticos têm focado principalmente a promoção do crescimento vegetal e o controle biológico de insetos-pragas ou de outros microrganismos (STURZ; MATHESON, 1996; CHANWAY, 1998; JAMES, 2000; AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI, 2000; LODEWYCKX et al., 2002).

#### 2.1.4 Bactérias rizosféricas associadas às plantas

Além dos microrganismos endofíticos, estão também associados às plantas os microrganismos habitantes da rizosfera. Em 1904, Hiltner definiu a rizosfera como "zona do solo no qual a microflora é influenciada pelas raízes" (HILTNER, 1904). No entanto, por razões de ordem prática, na maioria das vezes a rizosfera é definida como solo aderente às raízes (KANG; MILLS, 2004). Embora os limites físicos desses ambientes nem sempre são fáceis de definir, eles formam pontos distintos e importantes nas simbioses entre plantas e bactérias. Estas interações podem ser muito sensíveis às flutuações nos fatores ambientais, como a presença de microrganismos específicos (ANDREOTE et al., 2004), ou cultivo de diferentes espécies de plantas (SALLES et al., 2004).

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

As bactérias que interagem com plantas e são capazes de colonizar e persistir em suas raízes são denominadas rizobactérias (WELLER; THOMASHOW, 1994). Essas bactérias podem exercer efeitos positivos sobre as plantas, podendo promover o crescimento vegetal por influência direta (aumento da solubilização e entrada de nutrientes ou produção de reguladores de crescimento vegetal) ou indireta (supressão de patógenos, por produção de sideróforos ou antibióticos) (ASGHAR et al., 2002). Além de classificadas como rizobactérias, estas podem ser também diazotróficas, com a capacidade de converter nitrogênio atmosférico em amônia, enriquecendo a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livre ou estão associadas às plantas (DOBBELAERE; VANDELEYDEN; OKON, 2003).

Como as bactérias respondem diferentemente aos compostos liberados pela raiz, espera-se que diferentes composições de exsudados de raiz selecionem diferentes comunidades da rizosfera. Muitos estudos já demonstraram que algumas destas bactérias presentes na rizosfera possuem a habilidade de inibir doenças causadas por fungos ou por outras bactérias. Entretanto, ainda se faz

necessário um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos em cada antagonismo, assim como sobre a capacidade de colonização das raízes. Os mecanismos de antagonismo bacteriano incluem competição por nutrientes e espaço, indução de resistência por parte da planta e produção de antibióticos, sideróforos e enzimas que degradam a parede celular de fungos (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001).

### **2.1.5 Bactérias como promotoras do crescimento vegetal**

Os microrganismos endofíticos podem promover o crescimento vegetal por vários mecanismos, incluindo entre outros, a solubilização de fosfato (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), produção de ácido-indol-acético (LEE et al., 2000) e produção de sideróforos (COSTA; LOPER, 1994). Além disso, outros efeitos benéficos para o crescimento das plantas são atribuídos aos microrganismos endofíticos, que incluem o ajuste osmótico, regulação de estômatos, modificação morfológica da raiz, o reforço na absorção de minerais e alteração do metabolismo da planta (COMPANT et al., 2005a, b).

Bactérias da rizosfera, rizoplano, endofíticas e epifíticas podem beneficiar a planta hospedeira, aumentando seu crescimento, controlando patógenos ou melhorando seu desempenho em condições adversas (HALLMANN et al., 1997b) e influenciando o desenvolvimento de outras espécies cultivadas na mesma área (BEVER et al., 1997). Acreditava-se que as bactérias promotoras de crescimento vegetal eram principalmente bactérias associadas à rizosfera do hospedeiro. Contudo, tem sido demonstrado que as bactérias endofíticas são capazes de ocupar diferentes nichos biológicos únicos nas plantas, crescendo em muitos ambientes incomuns, podendo interagir intimamente com a mesma e proporcionando o crescimento do hospedeiro (STROBEL et al., 2004). Sendo assim, inúmeros estudos têm mostrado que bactérias endofíticas também podem promover o crescimento vegetal de diversas culturas de interesse, entre elas batata (FROMMEL et al., 1991; STURZ, 1995), milho (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; HINTON; BACON, 1995), pepino (RAUPACH; KLOPPER, 1998), arroz (HUREK et al., 1994; PRAYITNO et al., 1999); melancia (LIU et al., 1995), café (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES;

CABALLERO-MELLADO, 2001), cebola (SESSITSCH et al., 2005), e em cana-de-açúcar (CABALLERO-MELLADO et al., 2004; REIS et al., 2004; MENDES et al., 2007).

A capacidade de estímulo do crescimento das plantas pode ocorrer por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio ou produção de fitohormônios) e por mecanismos indiretos, exercendo antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas (DI-FIORE; DEL-GALLO, 1995; CHANWAY, 1998). Neste aspecto, bactérias endofíticas podem promover o crescimento da planta pelo aumento dos níveis de AIA e citocininas, pela redução dos níveis de etileno na planta (BUCHENAUER, 1998), aumentando a resistência a doenças e aumentando a produtividade das culturas (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000), produzindo substâncias análogas aos fitohormônios e/ou fixando nitrogênio (BASHAN; HOLGUIN, 1997; BASTIAN et al., 1998; CHRISTIANSEN-WENIGER, 1996) e por meio da solubilização de fosfato insolúvel (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001; ZAPATA; AXMANN, 1995).

#### **2.1.5.1 Bactérias fixadoras de nitrogênio**

O nitrogênio é um nutriente essencial para a vida e, em regiões tropicais, sendo freqüentemente limitante na produção agrícola. A maioria dos solos das regiões tropicais possui deficiência em nitrogênio, causando limitações à produção de alimentos. Este elemento é fundamental na formação de biomoléculas como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Porém, a maior parte do nitrogênio está na forma gasosa ( $N_2$ ), inerte para animais e vegetais. Na natureza, a incorporação do nitrogênio ao ecossistema é feita, principalmente, pelas bactérias fixadoras de nitrogênio, também chamadas de diazotróficas, que possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o nitrogênio atmosférico em amônio, que é subseqüentemente assimilado em aminoácidos e proteínas. Esse processo é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (NEVES; RUMJANEK, 1998). A FBN é responsável por cerca de 140 toneladas de nitrogênio fixado por ano, só nos ecossistemas terrestres, dando a esse processo enorme importância na manutenção da vida no planeta, situando-se como o segundo processo biológico mais abundante na terra, juntamente com a decomposição da matéria orgânica, estando atrás somente da fotossíntese. A FBN é realizada por uma série de

bactérias denominadas fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas, que podem ser de vida livre, associativas ou mutualísticas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Algumas destas bactérias podem ter evoluído no sentido de colonizar a rizosfera das plantas, beneficiando-se assim dos compostos ricos em carbono, que são exsudados pelas raízes (SPRENT; FARIA, 1989). Pesquisadores brasileiros têm identificado várias bactérias diazotróficas endofíticas, pertencentes principalmente aos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; BALDANI et al., 1997; REIS et al., 2004; WEBER et al., 2001).

O conhecimento da capacidade de um organismo em realizar a FBN é importante para a seleção de estirpes com potencial de exploração biotecnológica. A capacidade de bactérias realizarem este processo pode ser facilmente comprovada pela sua habilidade de crescer em meio de cultura livre de nitrogênio (NEVES; RUMJANEK, 1998); a condição de semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhantemente ao que ocorre no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerofílicas associadas às raízes de plantas. A formulação desse meio facilitou o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* e, após essa descoberta, muitas outras espécies de bactérias diazotróficas, entre elas *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp. foram isoladas no Brasil (BALDANI; BALDANI, 2005; OLIVEIRA et al., 2002).

No que diz respeito ao gênero *Burkholderia*, desde sua descrição em 1992, a espécie *B. vietnamiensis* foi a única espécie fixadora de nitrogênio representante do gênero. Recentemente, foi demonstrado que a fixação de nitrogênio (avaliada mediante ensaios de redução de acetileno e detecção dos genes *nifHDK*) é uma característica comum do gênero *Burkholderia* (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001). Desde então, cepas pertencentes ao gênero *Burkholderia* têm sido descritas pela capacidade de fixar nitrogênio e de formar nódulos em leguminosas (BALDANI; BALDANI, 2005; CHEN et al., 2006; MOULIN et al. 2001; VANDAMME et al., 2002). As espécies *B. unamae*, *B. tropica* e *B. vietnamiensis*, por exemplo, possuem capacidade de fixar N<sub>2</sub> quando se desenvolvendo em diferentes fontes de carbono comumente encontradas na rizosfera, como sacarose, frutose, succinato e malato. Já se sabe que as espécies *B. unamae*, *B. tropica*, descritas como fixadoras de N<sub>2</sub>, e a recentemente descrita *B. silvatlantica* (PERIN et al., 2006b) colonizam o ambiente rizosférico e tecidos internos de plantas de milho e de cana-de-açúcar (CABALLERO-MELLADO et al., 2004; REIS et al., 2004; PERIN et al., 2006a).

### 2.1.5.2 Bactérias produtoras de ácido-indol-acético (AIA)

As *Auxinas*, do grego *crecer*, são uma classe de fitohormônios capazes de afetar o crescimento vegetal, e, podem ser produzidas por plantas (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1998), bactérias (BAREA et al., 1976) e fungos (DVORNIKOVA; SKRIABIN; SUVOROV, 1970). Em plantas, estas substâncias são produzidas principalmente no meristema apical (gema) do caule e transportada através das células do parênquima até as raízes. As auxinas promovem o crescimento de raízes e caules, de maneira rápida (aumentando a elongação celular) ou de maneira lenta (através da divisão e diferenciação celular) (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Existem vários tipos de auxinas, entre elas, o ácido-indol-acético (AIA) (BROEK et al., 1999). A habilidade de sintetizar estes fitohormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003); sendo estas potencialmente utilizadas para a promoção do crescimento vegetal de plantas de muitas culturas (ARSHAD; FRANKENBERGER, 1998) ou na supressão do crescimento de ervas daninhas (KENNEDY, 1995).

Estima-se que cerca de 80% da comunidade bacteriana da rizosfera seja capaz de sintetizar AIA (LEINHOS; NAECK, 1994); e considerando que esta substância não funciona como um hormônio em células bacterianas, esta habilidade pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta (PATTEN; GLICK, 1996). Bactérias endofíticas dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Xanthomonas* podem promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios (PATTEN; GLICK, 1996).

### 2.1.5.3 Bactérias produtoras de sideróforos

O ferro é o segundo metal (após o alumínio) e o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre (CRICHTON; WARD, 1995). Todos os organismos vivos necessitam de ferro para seu crescimento e para realizar o metabolismo essencial à sua existência. Nos microrganismos o ferro é co-fator de muitas enzimas, e naqueles que crescem em condições aeróbicas, o ferro é

responsável pela redução do oxigênio durante a síntese de ATP, além de desempenhar um papel importante em muitas interações bactéria-planta (MILA; SCALBERT; EXPERT, 1996; NEILANDS, 1995; van VLIET et al., 1998).

Porém, este nutriente essencial, o ferro, não está prontamente disponibilizado em ambientes aquáticos, terrestres ou em hospedeiros animais. Assim, os microrganismos têm desenvolvido várias estratégias para adquirir ferro e, ao mesmo tempo, proteger-se dos seus efeitos tóxicos potenciais (GUERINOT, 1994; REIGH; O'CONNELL, 1993). A concentração de pelo menos 1 mM de ferro é necessária para um crescimento ótimo da maioria das espécies microbianas (NEILANDS, 1995), e em condições limitantes de ferro, alguns microrganismos produzem moléculas chamadas sideróforos (GRUSAK et al., 1999).

Os sideróforos são definidos como moléculas de baixo peso molecular com potencial quelante de íons férricos, sendo estas moléculas sintetizadas principalmente por microrganismos que crescem em ambientes com baixas concentrações de ferro. Nestes ambientes, o papel desses compostos é recolher os íons de ferro do ambiente, tornando esse elemento químico disponível para a célula microbiana. Esta assimilação pode ser melhorada pela ligação aos minerais de ferro sólidos, como por exemplo, óxidos de ferro, para facilitar o contato com o substrato (BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002).

Embora primariamente produzido para obtenção de ferro, os sideróforos também são capazes de se ligar a outros metais, como o magnésio, manganês, cromo (III), gálio (III) e radionuclídeos como plutônio (IV). Algumas das aplicações desta molécula são: tratamento de solo arenoso contaminado por metais (GADD, 2004), o uso de sideróforos como transportadores de antibióticos sintéticos (DIARRA et al., 1996), e o uso de sideróforos como biofertilizantes (RENGEL et al., 1999).

As bactérias podem promover o crescimento vegetal através da supressão de patógenos, na competição por nutrientes, por antibiose, ou pela síntese de sideróforos, que podem solubilizar e quelar ferro do solo e inibir o crescimento de microrganismos fitopatogênicos (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; SIDDIQUI, 2005) ou, em muitos casos, a produção de sideróforos pode induzir a resistência sistêmica da planta (COMPANT, 2005ab; van LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; SCHROTH; HANCOOK, 1995; ZEHNDER et al., 1997).

#### 2.1.5.4 Bactérias solubilizadoras de fosfato

O fósforo é o nutriente mais limitante no crescimento vegetal, apesar de ser encontrado comumente nos solos, onde ocorre em diferentes formas orgânicas e inorgânicas. Sua função além de estrutural e funcional é imprescindível na transferência de energia. Muitos solos são deficientes de fosfato na forma disponível para as plantas (fósforo livre), e mesmo em solos férteis a concentração deste nutriente é baixa, (BARROTI; NAHAS, 2000; GYANESHWAR et al., 2002) e, de acordo com BRAGA et al. (1991), os solos brasileiros são geralmente carentes em fósforo.

O fósforo é um elemento essencial para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas, pois melhora todo o sistema radicular e, conseqüentemente, a parte aérea (GONÇALVES et al., 2000). Em estágios mais avançados do crescimento, a falta de fósforo pode levar a atrofia dos caules e a morte das folhas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Dentre as possíveis medidas para evitar a deficiência nutricional de fósforo está utilização de processos microbiológicos para aperfeiçoar o aproveitamento do fosfato, cuja maior reserva mineral ocorre nas rochas, ou na forma não disponível para as plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001; ZAPATA; AXMANN, 1995).

Microrganismos da rizosfera desenvolveram a habilidade de solubilização de fosfato, convertendo o fosfato insolúvel em formas solúveis nos solos, e tornando-o disponível para as plantas (PRADHAN; SUKLA; DORRIS, 2005; KHAN et al., 2007). Dessa maneira, em solos, a solubilização de fosfato por bactérias é responsável por frações que variam de 1–50% do total de fosfato disponível as plantas, enquanto que a solubilização de fosfato por fungos representa 0,5%–0,1% do total. A alta proporção de microrganismos solubilizadores de fosfato está concentrada na rizosfera por ser uma região metabolicamente muito ativa e, que possui diversas fontes de fosfato, dependendo de cada tipo de rizosfera (VAZQUEZ et al., 2000). Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfato inorgânico. Entre os gêneros com esta capacidade estão: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).



### 2.1.6 Produção enzimática

O uso dos métodos moleculares pode fornecer respostas a perguntas sobre diversidade microbiana (ROSADO et al., 1997). Entretanto, apesar da grande contribuição das novas ferramentas moleculares para estudos em biodiversidade, as técnicas tradicionais de enriquecimento e cultivo são também importantes para o conhecimento da capacidade metabólica e das características fenotípicas dos microrganismos, sendo necessária uma abordagem através de vários enfoques (polifásica) para se chegar o mais próximo possível do quadro real da microbiota presente em determinado ambiente (MUYZER; SMALLA, 1998).

Os microrganismos endofíticos são considerados um reservatório para novos metabólitos secundários, oferecendo um potencial para a exploração médica, industrial e particularmente agrícola (STROBEL, 2003). Muitas dessas bactérias endofíticas são membros de gêneros comuns de solo, como *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Bacillus* (LODEWYCKX et al., 2002). Estes gêneros são bem conhecidos por sua diversificada gama de produtos de metabólitos secundários, incluindo antibióticos, compostos orgânicos voláteis, antifúngicos, antivirais e inseticidas (MILLER; UETZ, 1998).

As enzimas têm sido utilizadas pelo ser humano há milhares de anos, de duas formas: direta pelo emprego de extratos enzimáticos brutos de origem animal ou vegetal, e indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática decorrente do crescimento microbianos sobre determinados substratos. A produção e o uso de enzimas de origem microbiana, sob uma forma controlada tem tido um maior enfoque na indústria biotecnológica (JAEGER; EGGERT, 2002). Além disso, a produção de enzimas por microrganismos assegura um potencial ilimitado de suprimentos e ainda possibilita a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não é possível obter em fontes animais e vegetais (JESUS et al., 1999).

Nas células vegetais, o amido é um polímero de glicose que constitui o principal polissacarídeo de reserva energética. Muitos microrganismos produzem enzimas amilases, que degradam esse polímero em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas celulares (PASCHOLATI, 1995).

Para a celulose, um dos principais constituinte das células vegetais, a conversão enzimática em glicose é uma árdua tarefa, devido à natureza física do substrato. Na sua forma nativa, a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, que são ligadas por pontes de

hidrogênio (BÉGUIN, 1990). A conversão microbiana da celulose em açúcares simples necessita de enzimas, dentre elas as endoglicanases (GILKES et al., 1991), também conhecidas como celulasas, endo  $\beta$ -1,4 glicanases e carboximetil celulasas (SCHÜLEIN, 2000). Na maioria dos organismos, a produção de celulasas é reprimida na presença de altas concentrações de fontes de carbono prontamente metabolizáveis, como a glicose. Algumas bactérias e fungos produzem só um tipo de celulase, as endocelulasas, as quais por si mesmas, não são capazes de hidrolisar totalmente a celulose (ROUMAS, 1988). Os microrganismos endofíticos que produzem esse tipo de enzima podem beneficiar seu hospedeiro inibindo patógenos fúngicos, por meio da degradação das células da parede celular com a ação de enzimas tais como  $\beta$ -1,4 glicanases, levando a lise da parede celular e conseqüentemente a morte deste patógeno (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000).

As lipases e esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de microrganismos (REED, 1975). As enzimas lipolíticas, juntamente com as celulasas, constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas como enorme potencial para aplicações biotecnológicas (JAEGER; EGGERT, 2002). Existe certa confusão em torno da definição exata dos termos lipases e esterases. As lipases, denominadas verdadeiras, são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, liberados para as plantas, apresentando a capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. As esterases são as enzimas que agem em ésteres solúveis ou que hidrolisam outros lipídeos (acilhidrolases, colesteroesterase, tioesterases) (REED, 1975; CARVALHO et al., 2003). As principais aplicações destas lipases envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produção de produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas (JAEGER et al., 1997). Espécies de *Bacillus* e uma variedade de gêneros tais como *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Acinetobacter* têm sido destaques na produção de lipases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Alguns autores acreditam que metabólitos produzidos pelos microrganismos endofíticos podem não ser específicos para seus hospedeiros (KROHN et al. 1997a; SCHULZ et al. 2002), e apesar de não ter especificidade, estes metabólitos podem desempenhar algum papel dentro do

hospedeiro e/ou ter uma importância ecológica. De acordo com a hipótese de Demain (1980), um fungo pode produzir metabólitos *in vitro* que também devem ter uma função na natureza, afinal a manutenção de múltiplas seqüências necessárias para a síntese de metabólitos secundários não aconteceria sem que lhes rendessem algum efeito benéfico para a sua sobrevivência (DEMAIN, 1980), porém o papel destas enzimas pelos microrganismos endofíticos no ambiente não está clara (JUMPPONEN; MATTSON; TRAPPE 1998). A produção de certos tipos de enzimas, como as necessárias para degradação da celulose, conferem aos organismos vantagens nutricionais; a celulose, por exemplo, é uma importante fonte de energia e nutrientes, para os organismos capazes de degradá-la (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

As bactérias podem penetrar nos tecidos vegetais através de aberturas naturais e feridas, como também penetrar ativamente nestes tecidos através da produção de algumas enzimas, como pectinases e celulasas e outras enzimas hidrolíticas, visto que paredes de células vegetais são constituídas principalmente de celulose e pectina (na lamela mediana) (BARRAS et al., 1994; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001). Uma vez que estas enzimas também são produzidas por agentes patogênicos, um maior conhecimento sobre a sua regulação e expressão é necessária para distinguir bactérias endofíticas de patógenos de plantas (BARRAS et al., 1994; REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

### **2.1.7 Controle de fitopatógenos por bactérias associadas às plantas**

Ambientes naturais tendem a estar em equilíbrio, onde os organismos estão inter-relacionados, podendo restringir uns aos outros devido a competição por fontes de alimento, parasitismo, predação, entre outros mecanismos. A ação humana pode influenciar esse sistema, e isso pode ser facilmente exemplificado quando um organismo exógeno é introduzido, propositalmente ou por acidente, em um novo ambiente. Dessa forma pode-se sugerir que o surgimento de algumas doenças de plantas é consequência direta ou indireta da introdução de organismos estrangeiros. Nesse caso, o organismo originado de outro local pode encontrar um novo ambiente favorável, livre de competição e predação, e assim se estabelecer de forma

descontrolada, podendo se tornar uma doença (DEACON, 2005; FLEMING, 1968; DUNBAR; BEARD, 1975).

Sendo assim, os agentes biológicos com propriedades antagonistas têm recebido considerável atenção no controle de doenças de plantas, como alternativa aos pesticidas químicos (PARRET et al., 2003). O controle biológico é definido, em linhas gerais, como o uso de organismos selvagens ou modificados, genes ou produtos gênicos para diminuir os efeitos produzidos por pragas e doenças (COOK, 1986). Uma alternativa no controle biológico é o uso de bactérias endofíticas, que são capazes de reduzir ou evitar os efeitos deletérios de certos organismos patogênicos. Doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e, em alguns casos, até mesmo danos causados por insetos e nematóides, podem ser reduzidas após prévia inoculação de endófitos (STURZ et al., 2000; PING; BOLAND, 2004; HALLMANN; BERG; SCHULZ BERG, 2006).

Os microrganismos endofíticos e sua ação no controle biológico pode ser resultado de vários fatores como a produção de antibióticos, promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica. Para BUCHENAUER (1998), as bactérias associadas às raízes são capazes de produzir antibióticos, os quais são considerados um importante fator de antagonismo para outros microrganismos nas raízes, podendo impedir o desenvolvimento de patógenos.

As bactérias que habitam as plantas estão expostas a microambientes altamente competitivos com a interface solo-raiz ou rizosfera, a filosfera e o sistema vascular. Nestes ambientes, as bactérias freqüentemente competem por nutrientes e pela ocupação do nicho ecológico (PARRET et al., 2003). Como consequência, tais organismos necessitam desenvolver ferramentas para a competição intra e interespecífica, tais como a produção de antibióticos, enzimas degradativas e bacteriolíticas e bacteriocinas (DONG et al., 2004).

Várias bactérias associadas às plantas produzem bacteriocinas, compostos proteínicos sintetizados pelo ribossomo, que são ativas contra outras bactérias similares filogeneticamente (GROSS; VIDAVER, 1990; LAVERMICOCCA et al., 2002). Bacteriocinas podem ser usadas no controle biológico tomando como vantagem suas propriedades bactericidas específicas (JABRANE et al., 2002), o que as torna muito seguras para a utilização no ambiente (HEU et al., 2001).

### 2.1.8 O uso de técnicas moleculares no estudo da variabilidade genética de bactérias

Os microrganismos existem há aproximadamente 4 bilhões de anos, e a grande maioria de sua diversidade (mais de 95%) é ainda desconhecida, mesmo com o emprego das técnicas modernas da biologia molecular (MELO; TOCZYSKL, 2002). Estudos de variabilidade genética são de fundamental importância para o entendimento da interação endófito-planta e para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável baseada no controle biológico de pragas e doenças (AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI, 2000).

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

Outros genes vêm sendo amplamente utilizados em estudos filogenéticos, como o gene *gyrB* e o gene *nifH*. O gene *nifH* é um dos genes que em conjunto codificam a produção da proteína *FeMo*, componente da enzima nitrogenase, responsável pelo processo da fixação biológica do nitrogênio. Estudos com este gene estão voltados para comparação de bactérias diazotróficas, e as relações filogenéticas entre bactérias baseadas neste gene apresentam-se de maneira semelhante ao que ocorre com o 16S rDNA (ROSADO; DUARTE; MENDONÇA-HAGLER, 1999). O gene *gyrB* codifica uma topoisomerase tipo II, enzima que participa da helicoidização do DNA, e possui potencial para inferir filogenia, uma vez que está presente em todos os grupos bacterianos e apresenta limitada taxa de transferência horizontal (PAITAN et al., 1998; WATANABE et al., 2001).

Os métodos moleculares mais recentes e amplamente utilizados para o estudo de taxonomia e variabilidade de microrganismos têm sido as técnicas de seqüenciamento e os métodos eletroforéticos (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Um dos métodos eletroforéticos mais

utilizados é a metodologia de ARDRA (*Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado*), uma das formas de avaliar a variabilidade genética de uma comunidade bacteriana. Esta técnica é uma variação da técnica de RFLP (*Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição*) e consiste da digestão enzimática do DNAr amplificado por PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*) (VANEECHOUTTE et al., 1992). Os fragmentos de DNAr gerados e observados em gel de agarose podem ser tabulados e utilizados para a construção de árvores filogenéticas. Este método é baseado no princípio de que os sítos de restrição no DNAr são conservados de acordo com padrões filogenéticos (HEYNDRICKX et al., 1996; van ELSAS et al., 1998; RANJARD; POLY; NAZARET, 2000); formando grupos de acordo com a similaridade das bandas observadas. Estas bandas são padrões genéticos que mostram a diversidade entre indivíduos agrupando-os indivíduos de genótipos semelhantes (MOCALI et al., 2003; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). O poder de resolução desta técnica baseada no DNAr é valioso para identificar bactérias em nível de reino ou gênero, mas não de espécie ou subespécie (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; HAUBEN et al., 1999).

Outra técnica empregada para a caracterização molecular de comunidades bacterianas é a metodologia rep-PCR. Esta técnica também utiliza a PCR para relacionar o genótipo dos organismos, sendo usada em *fingerprints* genômicos com a utilização de *primers* correspondentes a regiões repetitivas (rep) ao longo do genoma (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995). Esses elementos repetitivos no DNA são observados em bactérias, e servem como sítios para *primers* na amplificação do DNA genômico (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995; DE BRUJIN, 1992). Existem diferentes famílias desses elementos de repetição no genoma de bactérias, das quais três já foram mais amplamente estudadas: (i) A seqüência *Palindrômica Repetitiva Extragênica* (REP) que possui de 35 a 40 pares de bases (ii) a seqüência *Consenso da Região Intergênica Repetitiva de Enterobactérias* (ERIC), de 124 a 127 pares de bases; e (iii) o elemento BOX de 154 pares de bases (VERVALOVIC et al., 1994; DE BRUJIN, 1992). Esses elementos parecem estar localizados em regiões intergênicas distintas ao longo de todo o cromossomo, e, assim, foram desenhados *primers* específicos para os diferentes elementos, sendo os protocolos de utilização denominados REP-PCR, ERIC-PCR ou BOX-PCR, de acordo com o elemento utilizado (KOEUTH; VERVALOVIC; LUPSKI, 1995; VERSALOVIC et al., 1994).

As bandas amplificadas no REP-PCR são separadas de acordo com seu tamanho em gel de agarose e geram um perfil que serve como uma impressão digital específica de cada estirpe

bacteriana (LUPSKI, 1993). É um método rápido e de alta resolução para classificar bactérias em nível de espécies, subespécies ou linhagem. BOX-PCR reúne várias vantagens, uma vez que é uma técnica rápida, de execução fácil e altamente discriminatória para espécies, produzindo resultados que representam bem as análises baseadas na homologia DNA-DNA (De BRUJIN, 1992).

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Isolados bacterianos**

Os isolados bacterianos utilizados foram obtidos de cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada, pertencentes à coleção de linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” Departamento de Genética, ESALQ/USP. Estas bactérias foram isoladas por Marcon, 2007 e Rossetto, 2008 durante o desenvolvimento do projeto “Interação entre Populações Microbianas e Plantas Geneticamente Modificadas” (Processo FAPESP 02/14143-3) coordenado pelo Dr. Welington Luiz de Araújo. No total, foram avaliados 39 isolados, sendo 20 endofíticos de raiz e 19 da rizosfera de cana de açúcar (Tabela 1).

Tabela 1 – Origem (local de isolamento), código de estoque, variedade da cana-de-açúcar e tratamento a qual as plantas foram submetidas antes da obtenção dos isolados utilizados neste trabalho

(continua)

Número de Isolados	Código dos Isolados	Origem dos Isolados	Variedade da cana-de-açúcar	Tratamento da cana-de-açúcar
1	TH2.3.3R3	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
2	TH2.3.3R4	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
3	TH2.1.3R2	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
4	TH2.2.3R3	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
5	TH2.4.1R1	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
6	CV2.1.2R2	Endof. Raiz	SP 801842	Convencional
7	CV2.4.3R2	Endof. Raiz	SP 801842	Convencional
8	TC3.3.1R6	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Capina
9	TC3.4.1R1	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Capina
10	TC3.4.2R1	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Capina
11	TC3.4.2R2	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Capina
12	TC3.4.2R3	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Capina
13	TH3.1.1R4	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
14	TH3.4.1R4	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
15	CV4.2.1R5	Endof. Raiz	SP 801842	Convencional
16	CV4.4.3R1	Endof. Raiz	SP 801842	Convencional
17	ESR63	Endof. Raiz	SP 801842	Convencional
18	ESR73	Endof. Raiz	SP 801842	Convencional
19	ESR100	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
20	ESR108	Endof. Raiz	SP 801842	Transgênica Herbicida
21	CV3.2.2F5	Rizosfera	SP 801842	Convencional
22	CV3.2.3F2	Rizosfera	SP 801842	Convencional
23	CV2.1.3F5	Rizosfera	SP 801842	Convencional
24	CV4.4.2F2	Rizosfera	SP 801842	Convencional
25	TC4.3.1F2	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Capina
26	TH4.4.3F1	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Herbicida



Tabela 1 – Origem (local de isolamento), código de estoque, variedade da cana-de-açúcar e tratamento a qual as plantas foram submetidas antes da obtenção dos isolados utilizados neste trabalho

				(conclusão)
Número de Isolados	Código dos Isolados	Origem dos Isolados	Variedade da cana-de-açúcar	Tratamento da cana-de-açúcar
27	CV3.1.1F1	Rizosfera	SP 801842	Convencional
28	CV3.1.2F4	Rizosfera	SP 801842	Convencional
29	CV3.2.3F3	Rizosfera	SP 801842	Convencional
30	TC3.3.1F1	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Capina
31	TC3.3.3F1	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Capina
32	TC3.4.1F2	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Capina
33	TC3.4.1F4	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Capina
34	TH3.1.3F3	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Herbicida
35	CV2.2.2F2	Rizosfera	SP 801842	Convencional
36	CV2.3.2F1	Rizosfera	SP 801842	Convencional
37	TC2.2.2F4	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Capina
38	TC2.2.2F5	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Capina
39	TH2.3.2F5	Rizosfera	SP 801842	Transgênica Herbicida

## 2.2.2 Caracterização baseada no fenótipo

### 2.2.2.1 Produção de enzimas

Os isolados bacterianos foram analisados em triplicata quanto à capacidade de produzir as enzimas amilases, endoglicanases, esterases e lipases. Controles positivos para a produção destas enzimas foram inoculados nos meios de cultura utilizados para estas caracterizações.

- **Atividade amilolítica:** Os isolados foram cultivados em meio Nutriente Ágar contendo 0,2% de amido solúvel (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975) a 28°C por até 72 horas. Após o crescimento bacteriano, foram adicionados 5 mL de solução de iodo (1%) sobre a placa

de Petri. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de amilases.

- **Atividade endoglicolítica:** As bactérias foram cultivadas em meio Carboximetilcelulose Agar 1% (WOOD; ERFLE; TEATHER, 1988) a 28°C por até 72 horas. Após o crescimento bacteriano, foram adicionados 10 mL do corante vermelho congo (1%) e posteriormente lavado com NaCl (5M). A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de endoglicanases.

- **Atividade esterásica:** As bactérias foram cultivadas em meio de cultura enriquecido com 1% de tween 80 (SIERRA, 1957) a 28°C por até 72 horas. Após o crescimento bacteriano, a presença de um halo cristalizado ao redor da colônia indicou a secreção de esterases.

- **Atividade lipolítica:** Os isolados foram cultivados em meio de cultura enriquecido com 1% de tween 20 (SIERRA, 1957) a 28°C por até 72 horas. Após o crescimento bacteriano, a presença de um halo cristalizado ao redor da colônia indicou a secreção de lipases.

## **2.2.2.2 Características relacionadas com a promoção de crescimento vegetal**

### **2.2.2.2.1 Fixação de nitrogênio**

Para a análise da fixação de nitrogênio foram utilizados tubos de ensaio de 20 x 70 mm, contendo 10 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, sem nitrogênio. As bactérias foram cultivadas em triplicatas no meio NFb por 72 horas a 28°C. A formação de película de crescimento no meio de cultura indicou a capacidade de fixar nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995). Após a formação da película, os isolados crescidos nos tubos de ensaio foram estriados em placas de Petri contendo meio de cultura NFb sólido, para a confirmação de que a película foi formada somente por um isolado bacteriano.

#### **2.2.2.2.2 Produção de ácido-indol-acético (AIA)**

As bactérias foram cultivadas em meio TSB (Tryptone Soya Broth, Merk) 10% contendo L-triptofano (5 mM) e incubadas no escuro a 28°C por 72 horas. Após este período as bactérias foram centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm e 900 µL do sobrenadante foi coletado e colocado em cubetas e adicionado 400 µL do Reagente de Salkowski (BRIC et al., 1991) e incubadas a 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período foram realizadas leituras no Espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000) com comprimento de onda de 530nm. As leituras foram normalizadas por meio de uma curva padrão previamente obtida com concentrações conhecidas de ácido-indol-acético comercial. Como controle positivo para produção de AIA foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* linhagem DH5α. As análises foram realizadas em triplicata para cada isolado.

#### **2.2.2.2.3 Produção de sideróforos**

A produção do meio de cultura para a detecção de sideróforos foi realizada de acordo com Shin et al., 2001; Silva-Stenico et al., 2005. Todos os isolados foram cultivados em meio CAS-Ágar a 28C por até 72 horas. Após o desenvolvimento das colônias o corante Cromoazurol S (CAS) presente no meio de cultura detectou produção de sideróforos (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Reações positivas foram registradas por uma mudança da cor do CAS reagente de azul a amarela ou laranja. As análises foram realizadas em triplicatas.

#### **2.2.2.2.4 Solubilização de fosfato inorgânico**

Para a solubilização de fosfato inorgânico os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura enriquecido com fosfato inorgânico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), de acordo com Verma; Ladha e Tripathi, 2001. Os isolados foram cultivados a 28°C por até 72 horas. A presença de um halo incolor em torno das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato. As análises foram realizadas em triplicata.

### **2.2.2.3 Ensaios de antagonismo, *in vitro*, contra patógenos de cana-de-açúcar**

Para estes ensaios, foram selecionados dois fitopatógenos de grande relevância na cultura de cana-de-açúcar.

#### **2.2.2.3.1 Ensaio de antagonismo, *in vitro*, contra *Fusarium verticillioides* (Método da cultura pareada)**

Para a realização deste ensaio, discos com cerca de 1 cm de diâmetro cortados de uma placa contendo *F. verticillioides* (Sin: *F. moniliforme*, SEIFERT, et al., 2003), cultivado em meio BDA (Batata Dextrose Ágar, Merk), foram colocados em um dos lados da placa de Petri e, do outro lado, os isolados de *Burkholderia* spp. foram inoculados com o auxílio de um palito descartável, de acordo com o Método da cultura pareada ou Pareamento (MARIANO, 1993). A presença de uma zona de inibição no crescimento do fungo foi observada em isolados com atividade antagônica. A análise do experimento foi realizada quando o controle, placa com apenas o disco fúngico, apresentou o crescimento de uma extremidade à outra da placa de Petri.

#### **2.2.2.3.2 Ensaios de antagonismo, *in vitro*, contra *Xanthomonas albilineans* (Produção de substâncias inibitórias do tipo bacteriocina - SITB)**

A análise da SITB dos isolados de *Burkholderia* spp. foi conduzida utilizando-se o método da sobre camada de ágar, descrito por Pugsley e Oudega (1987), com modificações de acordo com Gross e Vidaver (1990). Resumidamente, alíquotas de 10 µL das culturas dos isolados, cultivados por 48 horas foram gotejadas em placas contendo meio sólido; as quais foram incubadas por 48 horas, a 28°C. Para prevenir o posterior crescimento de células, após 48 horas, tais placas foram expostas ao vapor de clorofórmio (40 minutos). Em seguida, uma sobre camada de 5 mL de ágar semi-sólido (0,75%), contendo 50 µL ( $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>) de uma cultura da bactéria fitopatogênica, foi vertida sobre a placa. A produção de SITB foi avaliada após 48 horas de incubação a 28°C, por

meio da observação de zonas de inibição de crescimento da camada de bactéria indicadora ao redor da colônia da bactéria testada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **2.2.3 Caracterização baseada no genótipo**

#### **2.2.3.1 Extração de DNA genômico bacteriano**

Os isolados bacterianos foram cultivados em 5 mL de meio TSB a 28°C por 24 horas. As células presentes em 1,5mL deste cultivo foram peletizadas por centrifugação por 1 minuto a 10.000g. Os demais procedimentos para a extração de DNA foram realizados de acordo com Araújo et al., 2002. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1,0 %, (p/v) juntamente com o marcador de peso molecular DNA  $\lambda$  clivado com *HindIII*. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

#### **2.2.3.2 Caracterização da diversidade genômica**

##### **2.2.3.2.1 Amplificação e análise por BOX-PCR**

A análise dos isolados por BOX-PCR foi realizada com o *primer* BOX-1AR (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995) de acordo com o protocolo descrito em detalhes por Rademaker et al. (1998). Aliquotas de 12  $\mu$ L do produto de PCR foram carregadas em gel de agarose 1,5% (p/v) de 20 cm em 1 x TAE, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 1kb (Invitrogen), e corrida a 40 V por 16 horas. O gel foi corado com brometo de etídio, sobre luz ultravioleta e fotodocumentado. As imagens dos géis foram analisadas com o programa Gel ComparII.

### 2.2.3.3 Caracterização genética

Para caracterização genética dos isolados foram selecionadas metodologias baseadas no gene 16S rDNA, amplamente utilizado em estudos de filogenia bacteriana (STAHL, 1997); e no gene *gyrB*, selecionado por apresentar limitada taxa de transferência horizontal entre grupos bacterianos (PAITAN et al., 1998; WATANABE et al., 2001).

#### 2.2.3.3.1 Gene 16S rDNA

##### 2.2.3.3.1.1 Amplificação do gene 16S rDNA

Para a amplificação da região 16S rDNA foram utilizados os *primers* R1387 e PO27F (HEUER et al., 1997). As reações foram realizadas em um volume de 50  $\mu$ L, contendo 3,75 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1  $\mu$ L de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 minuto a 62,5°C; 1 minuto a 72°C, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. A confirmação do fragmento de DNA amplificado foi obtida com a migração por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* para observação de um fragmento de aproximadamente 1400pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

##### 2.2.3.3.1.2 Análise por ARDRA

A caracterização dos isolados por ARDRA foi realizada pela clivagem do fragmento amplificado do gene 16S rDNA, utilizando 1 $\mu$ g dos produtos de PCR que foram clivados com 2U enzima de restrição *HhaI*, (Fermentas Life Sciences, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de clivagem foram realizadas a 37°C por 2 horas, em volume final de 20 $\mu$ L. Após a digestão, toda a reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 2,2% (p/v) em 1 x

TAE, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Invitrogen). Em seguida o gel foi corado com brometo de etídio, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

#### **2.2.3.3.1.3 Seqüenciamento e análise do gene 16S rDNA**

Os produtos da amplificação do gene 16S rDNA foram seqüenciados no Setor de Seqüenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB/USP). Para tanto, os produtos de PCR gerados pelos *primers* P027F e 1387R foram purificados com polietileno glicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e submetidos ao seqüenciamento parcial deste mesmo gene, com o *primer* 1387R. As seqüências obtidas foram comparadas por BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997) contra a base nr/nt de dados do NCBI (*National center for biotechnology information website*). O alinhamento das seqüências e a análise filogenética foram conduzidos no programa MEGA 4.0.1 (TAMURA et al., 2007), e o agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Máxima Parcimônia* (MP) com bootstrap para 1000 replicatas.

#### **2.2.3.3.2 Gene gyrase (*gyrB*)**

##### **2.2.3.3.2.1 Amplificação do gene que codifica para DNA gyrase subunidade B (*gyrB*)**

Para a amplificação da região *gyrB* foram utilizados os *primers* UP-1 e UP-2r (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1995; 1998). As reações foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 3,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1 µL de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 62,5°C; 2 minutos a 72°C, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. A confirmação da amplificação do DNA de interesse foi feita comparando-se com a migração do fragmento gerado por eletroforese em gel de agarose

1,2% (p/v), juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder*. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado, sendo possível observar um fragmento de aproximadamente 1200pb. A seqüência de nucleotídeos do gene *gyrB* possui aproximadamente 1900bp (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), porém os primers utilizados (UP-1 e UP-2r) são capazes de gerar a amplificação de 1200bp (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1995,1998).

#### **2.2.3.3.2 Seqüenciamento e análise do gene gyrase (*gyrB*)**

Os produtos da amplificação do gene *gyrB* foram seqüenciados no Setor de Seqüenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB/USP). Para tanto, os produtos de PCR gerados pelos *primers* UP-1 e UP-2r (YAMAMOTO; HARAYAMA, 1995, 1998) foram purificados com polietileno glicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM) e submetidos ao seqüenciamento parcial do gene *gyrB* com o primer UP-1. As seqüências obtidas foram comparadas por BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997) contra a base nr/nt de dados do NCBI (*National center for biotechnology information website*). O alinhamento das seqüências e a análise filogenética foram conduzidos no programa MEGA 4.0.1 (TAMURA et al., 2007). O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Máxima Parcimônia* (MP) com bootstrap para 1000 replicatas.

### **2.2.4 Análises estatísticas**

#### **2.2.4.1 Caracterização baseada em fenótipo**

As análises quantitativas de produção das enzimas esterase e lipase, da produção de AIA, e solubilização de fosfato inorgânico foram conduzidas usando o software SAS (Copyright© 1989-1996 do SAS Institute, Cary, NC, USA), onde foi feita a análise de variância e a comparação de médias pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) (STEEL; TORRIE, 1980). As atividades enzimáticas para produção de esterase e lipase foram analisadas pelo método da difusão radial no meio de cultura



sólido indicando a atividade de maneira quantitativa, correlacionando os diâmetros do halo de degradação e da colônia, dando origem ao índice enzimático, calculado para cada um dos isolados, e avaliados com o software SAS.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Caracterização baseada no fenótipo

Os isolados avaliados foram negativos para a presença das enzimas endoglicanase e amilase. Já em relação às atividades esterásica e lipolítica, todos os isolados apresentaram resultado positivo. As atividades enzimáticas para produção de esterase e lipase foram analisadas pelo método da difusão radial no meio de cultura sólido, indicando a atividade de maneira quantitativa (Tabela 2). Comparando os dados obtidos, foi possível observar poucas diferenças estatísticas na produção de esterases e lipases pelos isolados. Os dados mostram que o índice enzimático para esterase variou de 1,29 a 3,94 cm, enquanto que para a atividade de lipases os valores obtidos estiveram entre 2,37 e 8,17 cm. No entanto, vale ressaltar o isolado CV2.1.2R2 (endofítico de raiz), que mostrou os maiores valores para a produção de ambas as enzimas.

Quanto às características para promoção de crescimento vegetal, foram selecionadas quatro técnicas: fixação de nitrogênio, produção de AIA, produção de sideróforos e solubilização de fosfato inorgânico. Todas estas características foram avaliadas sob condições de cultivo *in vitro*.

Todos os isolados apresentaram resultado positivo para produção de AIA e solubilização de fosfato inorgânico. A produção de AIA foi evidenciada pelas leituras em espectrofotômetro, enquanto que a solubilização de fosfato foi verificada pela difusão radial no meio de cultura sólido e formação de halo de degradação indicativo da utilização do fosfato previamente na forma insolúvel (Tabela 2). A produção de AIA foi determinada em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cultura, enquanto que a solubilização de fosfato foi quantificada de maneira similar ao índice enzimático. Os valores para produção de AIA pelos isolados endofíticos variaram de 3,43 a 9,97  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , já para isolados de rizosfera os valores variaram de 4,47 a 19,47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , este valor maior foi encontrado no isolado de rizosfera CV2.3.2F1, o melhor produtor de AIA entre todas os isolados avaliados. Os índices de solubilização de fosfato para isolados endofíticos mostraram valores entre 1,11 e 6,0 cm, e os

isolados de rizosfera apresentaram valores entre 2,32 e 3,48 cm. Foi observado que o isolado endofítico de raiz TH3.1.1R4 apresentou o maior halo de fosfato inorgânico solubilizado (6,0 cm).

Tabela 2 – Índices enzimáticos obtidos para as atividades de esterase e lipase, produção de AIA e solubilização de fosfato. Os dados foram originados de três repetições e valores seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

(continua)

Isolados (código)	Origem dos isolados	Atividade Esterásica (cm)	Atividade Lipolítica (cm)	Produção de (AIA $\mu\text{g.}$ $\text{mL}^{-1}$ )	Solubilização de Fosfato (cm)
TH2.3.3R3	Raiz (Endof.)	2,56 <sup>abcde</sup>	4,94 <sup>bcdefghij</sup>	9,97 <sup>bcde</sup>	2,58 <sup>cdefghi</sup>
TH2.3.3R4	Raiz (Endof.)	2,56 <sup>abcde</sup>	6,44 <sup>ab</sup>	9,80 <sup>bcde</sup>	2,45 <sup>cdefghi</sup>
TH2.1.3R2	Raiz (Endof.)	3,11 <sup>abc</sup>	4,83 <sup>bcdefghijk</sup>	7,37 <sup>bcdef</sup>	3,57 <sup>bcde</sup>
TH2.2.3R3	Raiz (Endof.)	1,95 <sup>cde</sup>	5,51 <sup>bcdef</sup>	6,50 <sup>bcdef</sup>	4,78 <sup>ab</sup>
TH2.4.1R1	Raiz (Endof.)	2,47 <sup>abcde</sup>	6,33 <sup>abc</sup>	6,40 <sup>bcdef</sup>	3,78 <sup>bc</sup>
CV2.1.2R2	Raiz (Endof.)	3,94 <sup>a</sup>	8,17 <sup>a</sup>	7,27 <sup>bcdef</sup>	2,34 <sup>cdefghi</sup>
CV2.4.3R2	Raiz (Endof.)	3,02 <sup>abcd</sup>	4,44 <sup>bcdefghijk</sup>	6,90 <sup>bcdef</sup>	1,11 <sup>ij</sup>
TC3.3.1R6	Raiz (Endof.)	1,67 <sup>cdef</sup>	5,57 <sup>bcde</sup>	8,27 <sup>bcdef</sup>	1,23 <sup>hij</sup>
TC3.4.1R1	Raiz (Endof.)	2,33 <sup>abcde</sup>	5,22 <sup>bcdefgh</sup>	7,27 <sup>bcdef</sup>	2,08 <sup>efghi</sup>
TC3.4.2R1	Raiz (Endof.)	2,27 <sup>bcde</sup>	3,86 <sup>cdefghijklm</sup>	7,57 <sup>bcdef</sup>	2,62 <sup>cdefghi</sup>
TC3.4.2R2	Raiz (Endof.)	1,97 <sup>cde</sup>	3,22 <sup>efghijklm</sup>	9,10 <sup>bcdef</sup>	2,39 <sup>cdefghi</sup>
TC3.4.2R3	Raiz (Endof.)	2,19 <sup>bcde</sup>	2,93 <sup>ghijklm</sup>	9,43 <sup>bcde</sup>	3,39 <sup>bcde</sup>
TH3.1.1R4	Raiz (Endof.)	2,48 <sup>abcde</sup>	3,33 <sup>efghijklm</sup>	5,73 <sup>def</sup>	6,0 <sup>a</sup>
TH4.4.1R4	Raiz (Endof.)	2,72 <sup>abcde</sup>	2,64 <sup>ijklm</sup>	6,53 <sup>bcdef</sup>	2,69 <sup>cdefghi</sup>
CV4.2.1R5	Raiz (Endof.)	1,37 <sup>def</sup>	1,39 <sup>mn</sup>	4,37 <sup>ef</sup>	1,89 <sup>efghi</sup>
CV4.4.3R1	Raiz (Endof.)	1,79 <sup>cde</sup>	4,25 <sup>bcdefghijk</sup>	3,43 <sup>f</sup>	1,36 <sup>fghij</sup>
ESR63	Raiz (Endof.)	1,29 <sup>ef</sup>	3,17 <sup>efghijklm</sup>	4,53 <sup>ef</sup>	1,32 <sup>ghij</sup>
ESR73	Raiz (Endof.)	1,71 <sup>cde</sup>	5,16 <sup>bcdefghi</sup>	9,43 <sup>bcde</sup>	2,97 <sup>cdefgh</sup>
ESR100	Raiz (Endof.)	2,15 <sup>bcde</sup>	3,83 <sup>cdefghijklm</sup>	4,33 <sup>ef</sup>	3,09 <sup>bcde</sup>
ESR108	Raiz (Endof.)	1,80 <sup>cde</sup>	3,04 <sup>fghijklm</sup>	5,97 <sup>cdef</sup>	2,16 <sup>defghi</sup>

Tabela 2 – Índices enzimáticos obtidos para as atividades de esterase e lipase, produção de AIA e solubilização de fosfato. Os dados foram originados de três repetições e valores seguidos de mesma letra indicam ausência de significância estatística de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Isolados (código)	Origem dos Isolados	(conclusão)			
		Atividade Esterásica (cm)	Atividade Lipolítica (cm)	Produção de (AIA $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )	Solubilização de Fosfato (cm)
CV3.2.2F5	Rizosfera	1,83 <sup>cde</sup>	3,48 <sup>efghijklm</sup>	8,37 <sup>bcdef</sup>	3,16 <sup>bcde</sup>
CV3.2.3F2	Rizosfera	1,8 <sup>cde</sup>	2,79 <sup>hijklm</sup>	4,40 <sup>ef</sup>	3,11 <sup>bcde</sup>
CV2.1.3F5	Rizosfera	1,80 <sup>cde</sup>	3,75 <sup>defghijklm</sup>	8,13 <sup>bcdef</sup>	2,7 <sup>cdefghi</sup>
CV4.4.2F2	Rizosfera	2,72 <sup>abcde</sup>	2,5 <sup>jklmn</sup>	5,47 <sup>def</sup>	2,45 <sup>cdefghi</sup>
TC4.3.1F2	Rizosfera	1,89 <sup>cde</sup>	2,89 <sup>ghijklm</sup>	5,33 <sup>def</sup>	3,17 <sup>bcde</sup>
TH4.4.3F1	Rizosfera	1,72 <sup>cde</sup>	3,84 <sup>cdefghijklm</sup>	5,77 <sup>cdef</sup>	2,32 <sup>cdefghi</sup>
CV3.1.1F1	Rizosfera	2,36 <sup>abcde</sup>	6,06 <sup>abcd</sup>	7,40 <sup>bcdef</sup>	2,48 <sup>cdefghi</sup>
CV3.1.2F4	Rizosfera	1,97 <sup>cde</sup>	4,87 <sup>bcdefghijk</sup>	5,53 <sup>def</sup>	2,63 <sup>cdefghi</sup>
CV3.2.3F3	Rizosfera	2,97 <sup>abcde</sup>	2,37 <sup>klmn</sup>	4,57 <sup>ef</sup>	2,07 <sup>defghi</sup>
TC3.3.1F1	Rizosfera	3 <sup>abcd</sup>	4,11 <sup>bcdefghijk</sup>	5,30 <sup>def</sup>	2,85 <sup>cdefgh</sup>
TC3.4.1F2	Rizosfera	1,69 <sup>cde</sup>	4,03 <sup>bcdefghijkl</sup>	7,83 <sup>bcdef</sup>	3,22 <sup>bcde</sup>
TC3.3.3F1	Rizosfera	2,33 <sup>abcde</sup>	3,56 <sup>efghijklm</sup>	5,93 <sup>cdef</sup>	3,07 <sup>cdef</sup>
TC3.4.1F4	Rizosfera	3,22 <sup>abc</sup>	4,12 <sup>bcdefghijk</sup>	12,10 <sup>b</sup>	3,48 <sup>bcde</sup>
TH3.1.3F3	Rizosfera	3,71 <sup>ab</sup>	3,67 <sup>defghijklm</sup>	8,17 <sup>bcdef</sup>	3,44 <sup>bcde</sup>
CV2.2.2F2	Rizosfera	2,87 <sup>abcde</sup>	5,04 <sup>bcdefghi</sup>	7,37 <sup>bcdef</sup>	3,79 <sup>bc</sup>
CV2.3.2F1	Rizosfera	2,73 <sup>abcde</sup>	3,67 <sup>defghijklm</sup>	19,07 <sup>a</sup>	2,88 <sup>cdefgh</sup>
TC2.2.2F4	Rizosfera	2,56 <sup>abcde</sup>	5,33 <sup>bcdefg</sup>	10,80 <sup>bcd</sup>	3,75 <sup>bcd</sup>
TC2.2.2F5	Rizosfera	2,27 <sup>bcde</sup>	4,58 <sup>bcdefghijk</sup>	10,17 <sup>bcde</sup>	3,83 <sup>bc</sup>
TH2.3.2F5	Rizosfera	3,33 <sup>abc</sup>	4,91 <sup>bcdefghij</sup>	9,97 <sup>bcde</sup>	2,98 <sup>cedfg</sup>

Os isolados foram também avaliados quanto ao potencial de fixar nitrogênio e de produzir sideróforos. O cultivo em meio NFb permitiu observar, por meio da formação da película (halo) no meio de cultura, a atividade da enzima nitrogenase (Figura 1), sendo 87,2% do total dos

isolados testados positivos para a fixação biológica de nitrogênio. Da mesma maneira, o cultivo das linhagens em meio apropriado foi possível observar, por meio da formação de um halo amarelado ao redor da colônia (Figura 2), onde 35,9% dos isolados foram positivos para a produção de sideróforos. Dos isolados endofíticos, apenas 25% foram capazes de formar o halo no meio de cultura, contra 47,4% dos isolados de rizosfera positivos para este teste, mostrando novamente que o melhor resultado, em número de isolados, foi observado para rizosfera.



Figura 1 – Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em NFb. **A)** Meio de cultura sem inóculo; **B)** Isolado negativo para fixação de nitrogênio (não houve formação da película); **C)** Isolado positivo para fixação de nitrogênio, com formação de película (seta)

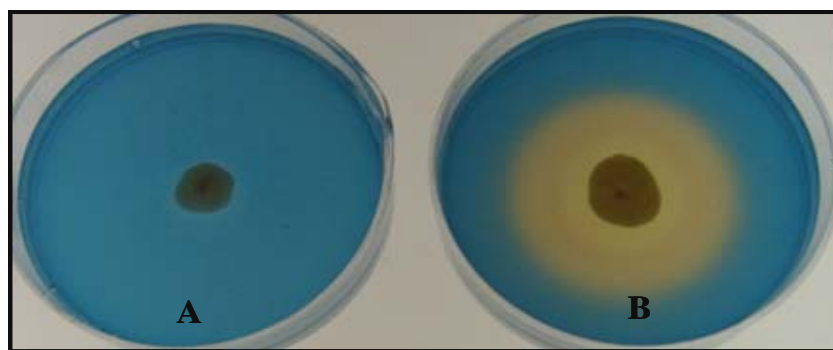


Figura 2 – Produção de sideróforos avaliada em meio CAS-Ágar. **A)** Isolado negativo para a produção de sideróforos (não houve formação de halo); **B)** Isolado positivo para a produção de sideróforos, com produção de halo ao redor da colônia

Considerando o possível antagonismo direto dos isolados sobre importantes patógenos da cultura de cana-de-açúcar, os isolados foram avaliados em relação ao potencial de controlar o crescimento dos patógenos *F. verticillioides* (Figura 3) e *X. albilineans* (Figura 4). Foi observado que apenas um isolado endofítico (CV4.4.3R1) não foi capaz de inibir *F. verticillioides*. No teste realizado com a bactéria *X. albilineans*, a formação de zonas de inibição de crescimento da camada desta bactéria patogênica ao redor da colônia das bactérias testadas (*Burkholderia* spp.), foi interpretada como capacidade de inibição deste patógeno (Figura 4). Assim, 65% dos isolados endofíticos de raiz foram capazes de inibir o crescimento deste patógeno, enquanto 84,2% dos isolados de rizosfera foram positivos para esta característica.

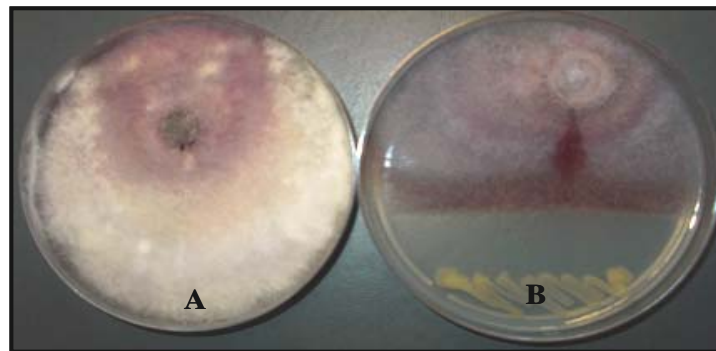


Figura 3 – Ensaio de antagonismo contra *F. verticillioides*. A) Controle; B) Isolado agindo como antagonista ao crescimento do patógeno *F. verticillioides*

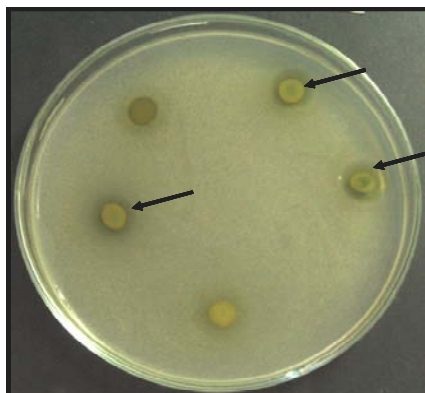


Figura 4 – Ensaio de antagonismo contra o patógeno de cana-de-açúcar *X. albilineans*, as setas indicam as zonas de inibição de crescimento da camada de bactéria patogênica ao redor da colônia da bactéria testada

### 2.3.2 Caracterização baseada no genótipo

A diversidade baseada no genótipo foi acessada por meio da técnica de BOX-PCR. Nesta análise, foram observados 6 grupos, sendo um formado por 5 isolados (CV4.4.3R1, ESR108, TC4.3.1F2, TC3.3.3F1 e CV3.2.3F2,) e mais divergente; um segundo grupo formado por 5 isolados (TH4.4.1R4, TC3.4.2R3, TC3.4.2R2, TC3.4.2R1 e TH3.1.3F3), um terceiro grupo formado por 13 isolados (TH3.1.1R4, CV3.1.1F1, TH2.2.3R3, TH2.1.3R2, TH2.3.3R3, TC2.2.2F5, TC2.2.2F4, CV2.3.2F1, CV3.1.2F4, TH4.4.3F1, CV2.4.3R2, CV2.1.2R2 e TH2.4.1R2); o quarto grupo formado por 3 isolados (ESR100, CV4.2.1R5 e CV3.2.3F3); o grupo 5 foi formado por 7 isolados (CV2.1.3F5, TH2.3.2F5, CV2.2.2F2, TC3.4.1F2, CV3.2.2F5, TC3.3.1R6 e ESR73); e o sexto e último grupo foi formado por 6 isolados (TC3.4.1F4, TC3.4.1R1, ESR63, TH2.3.3R4, TC3.3.1F1 e CV4.4.2F2) (Figura 5). Nenhum grupo foi formado com isolados de somente um local de origem, em todos há mistura entre os isolados endofíticos de raiz e as rizosféricos.

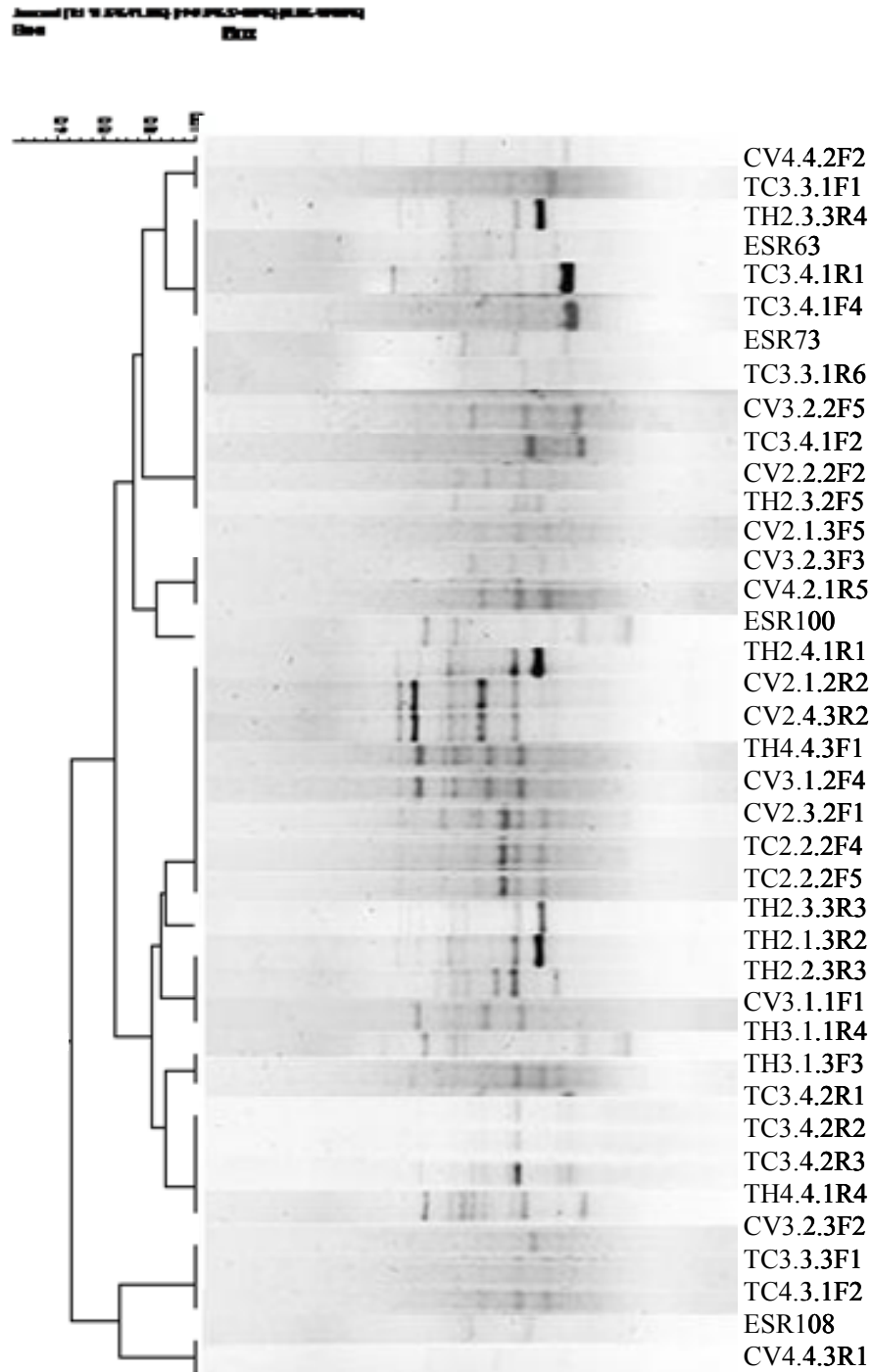


Figura 5 – Correlação das linhagens com base nos perfis de BOX-PCR. Os perfis genéticos gerados foram analisados e agrupados com o programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica), o agrupamento foi realizado por correlação de Jaccard das curvas densitométricas dos isolados

Além do acesso à diversidade genotípica por BOX-PCR, a diversidade genética foi acessada com o uso da técnica de ARDRA, tendo como alvo o gene 16S rDNA. Os perfis de restrição que foram observados em gel de agarose, gerados pela enzima de restrição *HhaI*, se diferenciaram em apenas 2 tipos, o isolados CV4.2.1R5 foi o único diferente de todas as demais.

Assim, todos os 39 isolados foram submetidos ao seqüenciamento da região 16S rDNA (aproximadamente 550pb) e analisados via BLASTn (Tabela 3). Foram observados valores de similaridade entre 91% e 100%, com as espécies *Burkholderia anthina*, *B. cepacia*, *B. cenocepacia* e *B. tropica*. Os isolados endofíticos de raiz apresentaram uma maior diversidade genética, visto que foram identificados como as espécies *Burkholderia* sp., *B. anthina*, *B. cepacia*, *B. cenocepacia* e *B. tropica*. Já os isolados de rizosfera foram identificados com as espécies *Burkholderia* sp., *B. cepacia* e *B. cenocepacia*.

Adicionalmente, após a obtenção das seqüências parciais do gene 16S rDNA, foi realizada a análise filogenética destas seqüências juntamente com seqüências originadas de linhagens tipo do gênero *Burkholderia*, que foram obtidas junto ao *Ribosomal data project website* (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foi possível observar a formação de sete grandes agrupamentos, além do enraizamento da árvore: o primeiro foi formado somente por 10 dos isolados deste trabalho; no segundo agrupamento duas seqüências do banco de dados (EF602567.1 *B. cenocepacia* e AB9176.1 *B. cepacia*) ficaram agrupadas entre 6 dos isolados; um terceiro agrupamento foi formado por 7 isolados que ficaram agrupados a X87275.1 *B. cepacia*, juntamente com outras 3 linhagens agrupadas a *B. anthina*. O quarto agrupamento foi formado por 2 pequenos clados: um com 3 isolados endofíticos de raiz, e outro clado formado por 5 isolados de rizosfera. No quinto agrupamento, 3 isolados se agruparam com 5 seqüências do banco de dados: M22518.1 *B. cepacia*, U96927.1 *B. cepacia*, EF634151.1 *B. cenocepacia*, U96930.1 *B. pyrrocinia* e AF148554 *B. stabilis*. O sexto agrupamento foi formado por 9 seqüências do banco de dados: U96936.1 *B. phenazinium*, AY497470.1 *B. phytofirmans*, AY752958.1 e AY773196.1 *B. mimosarum*, EU024154.1 e U96941.1 *B. graminis*, EF139182.1, AJ420332.1 e AY 128103.1 *B. tropica*, e dois isolados (CV3.2.3F3 e CV4.2.1R5) que ficaram agrupados a estas três seqüências de *B. tropica*, condizendo com os resultados do seqüenciamento. O sétimo agrupamento foi formado somente por seqüências prévias: U96932.1 e U96933.1 *B. plantarii*, Y18703 *B. multivorans*, AF148556 *B. cenocepacia*, X80287.1 e X80286.1 *B. cepacia*. O enraizamento foi formado por Y10825.1 *Cupriavidus necator*, AF300325.1 *C. taiwanensis*, AJ270258 *Ralstonia mannitolilytica* e



X67036.1 *R. solanacearum*. Foi observado que os isolados avaliados se agrupam aleatoriamente, pois apenas o quarto agrupamento revelou dois pequenos clados separando os isolados de acordo com sua origem (Figura 6).

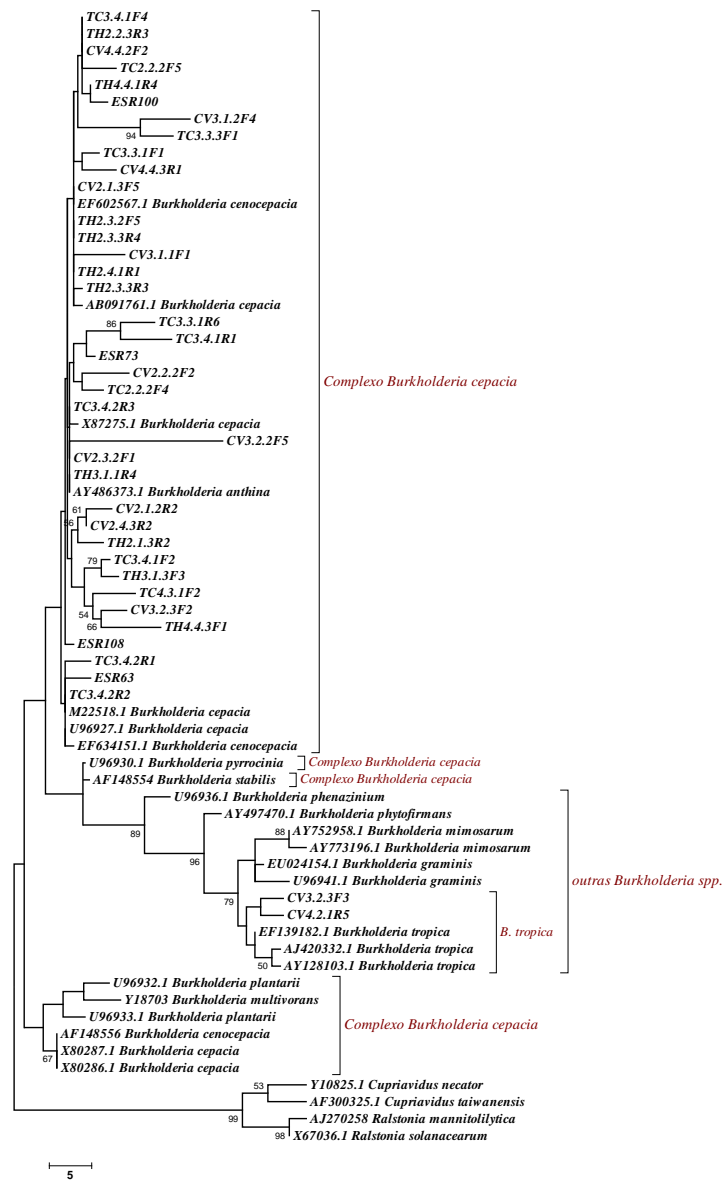


Figura 6 – Árvore filogenética baseada na comparação das seqüências com cerca de 550pb do gene 16S rDNA dos isolados com as seqüências disponíveis no banco de dados. Os agrupamentos foram calculados com o método de *Máxima Parcimônia* (MP). Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50. As seqüências de *Cupriavidus necator*, *C. taiwanensis*, *Ralstonia mannitolilytica* e *R. solanacearum* foram utilizadas como grupo externo

Após as análises do gene 16S rDNA, foi verificado que este gene não permitiu a identificação precisa dos isolados, embora tenha mostrado que os isolados estudados compõem o CBC, com exceção de CV4.2.1R5 e CV3.2.3F3, que ficaram agrupados à *B. tropica*.

Todos os 39 isolados foram também submetidos ao seqüenciamento parcial do gene *gyrB* (aproximadamente 550pb) e suas respectivas filogenias foram inferidas por meio da utilização da ferramenta BLASTn contra a base de dados nt/nr do banco de dados. Da mesma forma que o gene 16S rDNA todos os isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia*, com similaridade variando entre 88% e 100%, e afiliação com as espécies *B. cepacia* e *B. plantarii*. (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados do seqüenciamento parcial dos genes 16S rDNA e *gyrB*, a identificação por similaridade foi realizada com o programa BLASTn contra a base de dados nt/nr do banco de dados

(continua)

Isolados (código)	Origem dos isolados	Identificação BLAST					
		Gene 16S rDNA	Similaridade (%)	Acesso	Gene <i>gyrB</i>	Similaridade (%)	Acesso
TH2.3.3R3	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	98	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190575.1
TH2.3.3R4	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	99	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	92	AB190576.1
TH2.1.3R2	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cepacia</i>	95	AF097532.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	95	AB190576.1
TH2.2.3R3	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cepacia</i>	99	AY946011.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	92	AB190575.1
TH2.4.1R1	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cepacia</i>	99	AY946011.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	96	AB190576.1
CV2.1.2R2	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia anthina</i>	97	AY486373.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	91	AB190576.1
CV2.4.3R2	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia</i> sp.	99	EF602562.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	93	AB190576.1
TC3.3.1R6	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cepacia</i>	91	AB015606.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	90	AB190575.1
TC3.4.1R1	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia</i> sp.	92	EF602562.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190576.1
TC3.4.2R1	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia</i> sp.	99	AB298718.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190576.1
TC3.4.2R2	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia</i> sp.	92	AB298718.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	96	AB190576.1
TC3.4.2R3	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	97	EF602566.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190575.1
TH3.1.1R4	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia</i> sp.	99	DQ094147.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190575.1

Tabela 3 – Dados do seqüenciamento parcial dos genes 16S rDNA e *gyrB*, a identificação por similaridade foi realizada com o programa BLASTn contra a base de dados nt/nr do banco de dados

(continuação)

Isolados (código)	Origem dos isolados	Identificação BLAST					
		Gene 16S rDNA	Similaridade (%)	Acesso	Gene <i>gyrB</i>	Similaridade (%)	Acesso
TH3.4.1R4	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	99	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	92	AB190576.1
CV4.2.1R5	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia tropica</i>	96	EF139183.1	<i>Burkholderia plantarii</i>	88	AB220903.1
CV4.4.3R1	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	97	EF602565.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	86	AB190576.1
ESR63	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia sp.</i>	99	EF602558.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	93	AB190575.1
ESR73	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia sp.</i>	96	EF602559.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190575.1
ESR100	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	99	EF602566.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	96	AB190576.1
ESR108	Raiz (Endof.)	<i>Burkholderia sp.</i>	97	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	95	AB190576.1
CV3.2.2F5	Rizosfera	<i>Burkholderia cepacia</i>	92	AB272341.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	91	AB190576.1
CV3.2.3F2	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	96	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	96	AB190576.1
CV2.1.3F5	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	92	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190576.1
CV4.4.2F2	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	98	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	93	AB190575.1
TC4.3.1F2	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	95	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	93	AB190576.1
TH4.4.3F1	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	96	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	91	AB190575.1
CV3.1.1F1	Rizosfera	<i>Burkholderia sp.</i>	95	DQ977698.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190575.1
CV3.1.2F4	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	100	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	86	AB190576.1
CV3.2.3F3	Rizosfera	<i>Burkholderia tropica</i>	90	EF139183.1	<i>Burkholderia plantarii</i>	88	AB220903.1
TC3.3.1F1	Rizosfera	<i>Burkholderia cepacia</i>	96	DQ846736.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	89	AB190576.1
TC3.3.3F1	Rizosfera	<i>Burkholderia sp.</i>	97	EF602560.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	AB190576.1
TC3.4.1F2	Rizosfera	<i>Burkholderia cepacia</i>	98	AY741351.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	96	AB190575.1
TC3.4.1F4	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	99	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	97	AB190576.1
TH3.1.3F3	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	96	EF602567.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	90	AB190576.1
CV2.2.2F2	Rizosfera	<i>Burkholderia sp.</i>	97	EF602559.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	92	AB190576.1

Tabela 3 – Dados do seqüenciamento parcial dos genes 16S rDNA e *gyrB*, a identificação por similaridade foi realizada com o programa BLASTn contra a base de dados nt/nr do banco de dados

(conclusão)

Isolados (código)	Origem dos isolados	Identificação BLAST					
		Gene 16S rDNA	Similaridade (%)	Acesso	Gene <i>gyrB</i>	Similaridade (%)	Acesso
CV2.3.2F1	Rizosfera	<i>Burkholderia</i> sp.	98	EF602562.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	92	AB190576.1
TC2.2.2F4	Rizosfera	<i>Burkholderia</i> sp.	95	DQ813317.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	93	AB190576.1
TC2.2.2F5	Rizosfera	<i>Burkholderia cepacia</i>	94	EF054874.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	95	AB190576.1
TH2.3.2F5	Rizosfera	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	98	EF602565.1	<i>Burkholderia cepacia</i>	96	AB190575.1

Com a obtenção das seqüências parciais do gene *gyrB*, a análise filogenética foi conduzida, juntamente com seqüências obtidas com as previamente disponíveis no banco de dados (Figura 8). Nesta análise, foi observada a formação de nove grandes grupos: o primeiro deles foi formado somente com 11 isolados deste trabalho; um segundo agrupamento foi formado por 8 isolados juntamente com a seqüência AY996864.1 *B. cepacia*. No terceiro agrupamento, novamente 8 isolados não se agruparam a nenhuma seqüência do bando de dados. O quarto agrupamento foi formado por 4 isolados juntamente com EU240559.1 e AY996882.2 *B. cenocepacia*. No quinto agrupamento, 3 dos isolados se agruparam a AY996866.1 *B. cepacia*. No sexto agrupamento, 2 dos isolados ficaram agrupados a EU24056.1 *B. cenocepacia*, porém outras duas seqüências do banco de dados também ficaram neste grupo AB190575.1 e AY996867.1 *B. cepacia*. No sétimo agrupamento ficaram somente duas seqüências do banco de dados: AY996891.1 *B. cenocepacia* e AB190576.1 *B. cepacia*. Uma única seqüência ficou separada das demais, EU240569.1 *B. pyrrocinia*, e formou o oitavo agrupamento. O nono agrupamento foi formado por 5 seqüências prévias: EU240569.1 *B. anthina*, AY996876.1 *B. multivorans*, AB220903.1, AB190664.1 e AB190666.1 *B. plantarii*, juntamente com dois dos isolados (CV4.2.1R5 e CV3.2.3F5), que ficaram agrupados com as seqüências de *B. plantarii*, condizendo com o dado do seqüenciamento parcial do gene *gyrB*. O enraizamento desta árvore foi formado por AB014991.1 *Cupriavidus necator*, EU024219.1 *C. taiwanensis*, DQ657359.1 *Ralstonia mannitolilytica* e DQ657417.1 *R. solanacearum*.

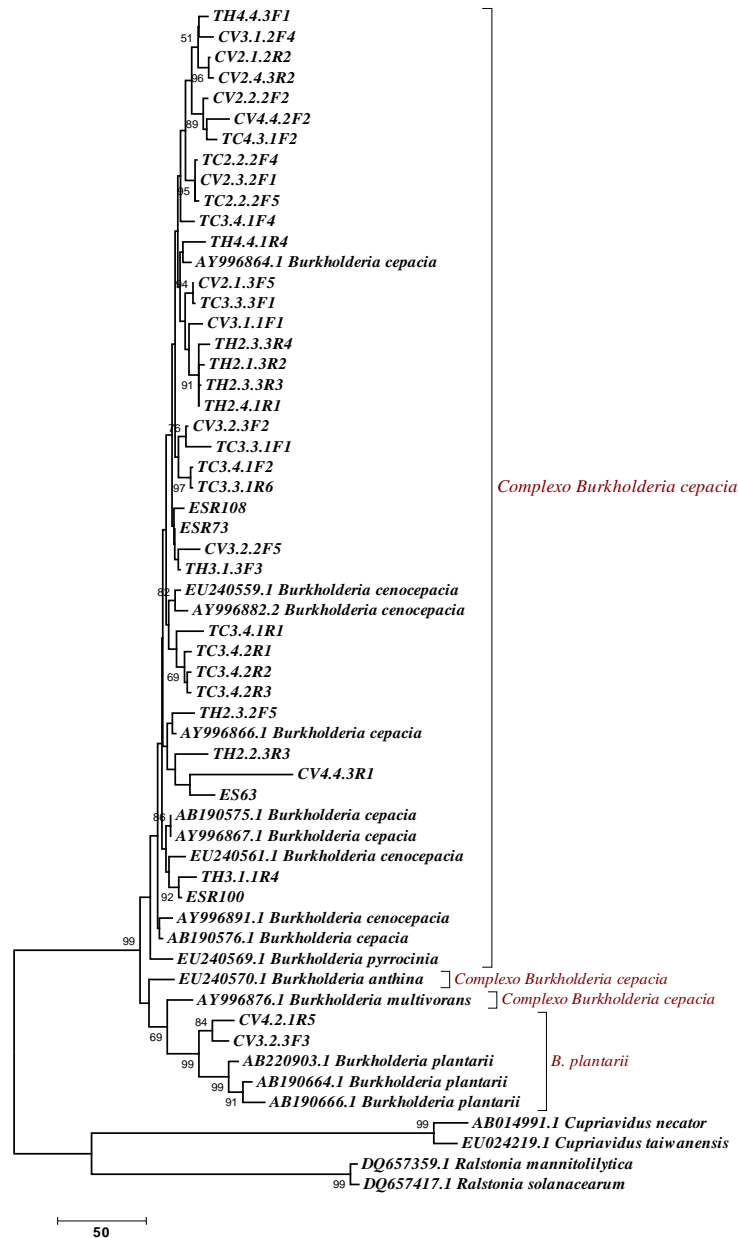


Figura 7 – Árvore filogenética baseada na comparação das seqüências do gene *gyrB* das linhagens com as seqüências disponíveis no banco de dados. O agrupamento calculado com o método de *Máxima Parcimônia* (MP). Os dados nos ramos indicam os valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações, sendo apenas apresentados valores maiores do que 50. As seqüências de *Cupriavidus necator*, *C. taiwanensis*, *Ralstonia mannitolilytica* e *R. solanacearum* foram utilizadas como grupo externo

Embora tenha sido utilizado um maior número de espécies da população de *Burkholderia* obtida do interior das raízes, em nenhuma das análises realizadas foi observada correlação entre a variação genética ou fenotípica com o nicho ocupado (endofítico ou rizosférico).

## 2.4 Discussão

O desenvolvimento das plantas sofre constantemente influência da vida microbiana ao seu redor, seja por meio de espécies endofíticas, habitantes da rizosfera, distribuídas no solo ou até mesmo dispersas no ar. Neste aspecto, se torna interessante um maior entendimento sobre a vida microbiana relacionada às plantas. Assim sendo, o presente trabalho teve como foco o estudo de bactérias do gênero *Burkholderia* relacionadas a uma das culturas de maior interesse mundial, a cana-de-açúcar. Estas bactérias foram isoladas de dois ambientes diferentes: raiz e rizosfera de cana-de-açúcar; buscou-se, então, avaliar a presença de características específicas para isolados endofíticos ou rizosféricos, que estivessem relacionadas à adaptação aos nichos ocupados.

Trabalhos recentes têm descrito a importância do gênero *Burkholderia* na cultura da cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997; DÖBEREINER et al., 1995; JAMES, 2000; OLIVEIRA et al., 2002; PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001; PERIN et al., 2006ab). Recentemente, Mendes et al. (2007) relataram, pela primeira vez, que bactérias ligadas ao CBC compõem uma parte integrante da comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar, fato que torna este estudo bastante interessante. Este gênero é composto por bactérias com extrema versatilidade nutricional, que reflete na sua capacidade de utilizar uma ampla gama de compostos orgânicos como fontes de carbono (GILLIS et al., 1995), o que certamente contribui para seu sucesso ao concorrerem pelos exsudados das raízes e, assim, de forma eficiente a colonizar habitats tais como a raiz da planta. Estas bactérias também são componentes importantes da comunidade microbiana do solo (DALMASTRI et al., 1999); por exemplo, a primeira *Burkholderia cepacia* foi descrita como o agente causador da podridão mole de cebola (BURKHOLDER, 1950), mas várias estirpes desta espécie não são fitopatogênicas e desempenham papel importante na promoção da saúde vegetal (BEVIVINO et al., 1998), que pode ocorrer através da produção de fitohormônios, da fixação de nitrogênio atmosférico (van TRAN et al., 2000), ou até pela capacidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana (CARTRIGHT; CHILTON; BENSON, 1995; EL BANNA; WINKELMANN, 1998; HU; YOUNG, 1998; KANG et al., 1998).

Quanto à capacidade dos isolados de *Burkholderia* spp. em produzir enzimas, foi observado que, neste trabalho, os isolados não produziram amilase e celulase. Tendo em vista o gasto de energia investido pela célula bacteriana para a produção de enzimas, principalmente em

substratos difíceis de serem metabolizados, como a celulose, é possível sugerir que a disponibilidade de outras fontes de carbono, prontamente metabolizáveis, seja um fator de seleção negativo para espécies produtoras destas enzimas, como sugerido por Roumas (1988).

Em relação à produção das enzimas esterase e lipase, todos os isolados foram positivos, e os índices enzimáticos observados e analisados estatisticamente, revelam que há diferenças nas produções entre os isolados, mas não há um padrão em quantidade de produção (índice enzimático) para isolados endofíticos de raiz ou rizosféricos. Vale ressaltar que um mesmo isolado endofítico de raiz, CV2.1.2R2, apresentou o mais alto índice de produção para ambas as enzimas, mostrando que este isolado apresenta um maior potencial para produção destas enzimas. As enzimas esterase e lipase têm a atenção de indústrias, principalmente para aplicações como: tratamento de óleos e gorduras, produção de detergentes, processamento de alimentos, síntese de produtos químicos e farmacêuticos, fabricação de papel e produção de cosméticos (HENDRICKSON, 1997ab; KAZLAUKAS; BORNSCHEUER, 1998).

Com o restante das avaliações fisiológicas desenvolvidas neste trabalho, foi observado que os isolados utilizados têm potencial para a promoção de crescimento vegetal, visto que foram capazes de fixar nitrogênio, produzir AIA e sideróforos, além de solubilizar fosfato inorgânico.

O conhecimento da capacidade de um organismo em realizar fixação biológica de nitrogênio é importante para a seleção de linhagens com potencial de exploração biotecnológica. Esta capacidade pode ser facilmente comprovada pela sua habilidade de crescer em meio de cultura livre de  $N_2$  fixado (DÖBEREINER et al., 1995). A fixação de nitrogênio é uma característica comum de bactérias endofíticas, pois o ambiente dentro da planta pode ser um nicho adequado para a fixação de  $N_2$ , visto que neste ambiente as bactérias diazotróficas têm acesso a um nicho com baixa quantidade de  $O_2$  e com baixos níveis de nitrogênio, exigido para a expressão do complexo nitrogenase, e assim pode permitir a fixação de nitrogênio, convertendo o  $N_2$  atmosférico em amônia, assimilável pelas plantas (BALDANI; BALDANI, 2005; JAMES; OLIVARES, 1998; OLIVEIRA et al., 2002; STEENHOUDT et al., 2000). Além disso, dentro das raízes das plantas as bactérias diazotróficas endofíticas não sofrem limitação de substâncias ricas em carbono, enfrentando competição com um menor número de microrganismos e podendo, então, transferir muito mais eficientemente os compostos nitrogenados produzidos para a planta (NEVES; RUMJANEK, 1998). Porém, neste trabalho, os resultados demonstram que a população de rizosfera pode ter sido selecionada para esta finalidade. Nestes ambientes (rizosféricos) a

concentração de  $O_2$  é maior que no interior da planta, assim, sugere-se que devem existir microambientes com menores quantidades de  $O_2$ , ou então a rizosfera seria apenas um reservatório de bactérias fixadoras. Vários autores têm relatado espécies de *Burkholderia* fixadoras de nitrogênio, como também espécies novas têm sido descritas neste sentido, como *Burkholderia unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), *Burkholderia xenovorans* (GORIS et al., 2004), *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004) e *Burkholderia silvatlantica* (PERIN et al., 2006b). Sendo assim, a fixação de nitrogênio parece ser uma propriedade comum do gênero *Burkholderia* (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; REIS et al., 2004; ZHANG et al., 2000), que pode ser explorada para melhoramento de culturas onde estas bactérias estejam relacionadas, como a cana-de-açúcar.

A análise da produção de AIA demonstrou que todos os isolados produziram este fitohormônio, sendo que a população da rizosfera apresentou um maior nível de produção. Esta característica pode estar associada à promoção de crescimento vegetal, pois tendo em vista que o AIA aparentemente não funciona como um hormônio em células bacterianas, esta habilidade pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta (PATTEN; GLICK, 1996). Além da produção de hormônios, a capacidade de bactérias em solubilizar fosfato inorgânico também é um fator envolvido na interação bactéria-planta, visto que esta característica aumenta a disponibilidade de fosfato viável para o vegetal, sendo este um possível mecanismo de promoção de crescimento vegetal em condições de campo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Embora o maior índice de solubilização de fosfato tenha sido observado em uma linhagem endofítica de raiz, o restante dos isolados apresentou índices que praticamente não diferem na análise estatística, demonstrando que esta é uma característica comum entre os isolados de *Burkholderia*.

Várias bactérias também podem melhorar o crescimento vegetal através da supressão de patógenos, na competição por nutrientes, por antibiose, ou pela síntese de sideróforos, que podem solubilizar e quelar ferro do solo e inibir o crescimento de microrganismos fitopatogênicos (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003). A produção de sideróforos por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal é considerada importante na supressão de microrganismos deletérios e patógenos de plantas presentes no solo (SIDDIQUI, 2005), principalmente fungos patogênicos, visto que os sideróforos dos fungos apresentam menor afinidade pelo ferro (LOPER; HENKELS, 1999; O'SULLIVAN; O'GARA, 1992). Além disso,



os sideróforos podem induzir mecanismos de resistência na planta (COMPANT, 2005 ab; van LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998; SCHROTH; HANCOOK, 1995; ZEHNDER et al., 1997). A síntese de sideróforos pode ser influenciada por vários fatores, entre eles o pH, o teor de ferro e ferro fundido a forma de íons, a presença de outros oligoelementos, e uma oferta adequada de carbono, azoto e fósforo (DUFFY; DÉFAGO, 1999). Um teste universal para a detecção de sideróforos foi desenvolvido por Schwyn e Neilands (1987), o teste CAS, que é baseado na quelação do ferro por qualquer classe de sideróforos. A análise universal com Cromoazurol S pode detectar sideróforos totais em meios quimicamente definidos independentemente da natureza química dos sideróforos. O método CAS detecta pela mudança de cor do complexo CAS-ferro de azul para laranja após a quelação de ferro vinculada pelos sideróforos (BARRY, 1991; SCHWYN; NEILANDS, 1987). Os sideróforos sintetizados pelo gênero *Burkholderia* constituem uma opção viável para biocontrole, pois a planta pode suprimir o crescimento de patógenos pela retirada do ferro daquele ambiente, visto que o ferro é fator limitante para o crescimento de muitos agentes patogênicos na rizosfera (PARKE; RAND, 1991). Neste trabalho, os melhores produtores de sideróforos foram os isolados da rizosfera, capacidade esta que pode estar relacionada com a maior competitividade nestes ambientes rizosféricos.

Fungos patogênicos para plantas causam danos as culturas dignos de milhões de dólares em todo o mundo, apesar do amplo uso de pesticidas químicos. Por isso, a procura de técnicas alternativas de biocontrole sem utilizar qualquer fungicida sintético vem aumentando (COPPING; MENN, 2000). Nas últimas décadas, muitos cientistas têm conduzido suas investigações sobre o desenvolvimento de microrganismos antagonistas para patógenos de plantas, já que estes podem produzir substâncias químicas mais seguras que os fungicidas sintéticos (WAKAYAMA et al., 1984; EL-BANNA; WINKELMANN, 1998). Neste sentido, CBC organismos produzem um número de substâncias que antagonizam o crescimento de patógenos de plantas presentes no solo (BEVIVINO et al., 2000, HEUNGENS; PARKE, 2000). Exemplificando, algumas das bactérias utilizadas neste trabalho (ESR63, ESR73, ESR100, ESR108) foram avaliadas anteriormente por Mendes et al. (2007), quanto à capacidade de produzir Pirrolnitrina, que é um metabólito antifúngico com atividade antagonista contra uma grande variedade de fungos patogênicos de plantas e até de patogênicos humanos (HILL et al., 1994; LIGON et al., 2000). A Pokkah boeng, doença causada por *Fusarium verticillioides* (Sin: *F. moniliforme*, SEIFERT, et al., 2003), pode causar significantes quedas da produção e perdas econômicas nos cultivos comerciais de cana-de-

açúcar (RAID, 1998). De acordo com Mendes et al. (2007), a alta frequência de espécies de *Burkholderia* entre as bactérias endofíticas isoladas de plantas de cana-de-açúcar e sua forte atividade de inibir o crescimento de *F. verticillioides* torna estes isolados candidatos potenciais para o controle da doença Pokkah boeng.

Outra doença que causa preocupação no setor canavieiro é a escaldadura das folhas, provocada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, pois, quando esta doença se manifesta em variedades extremamente suscetíveis, pode levar a perdas de até 100%. Esta bactéria pode sobreviver de ano a ano em plantas infectadas, sendo disseminada na colheita e, possivelmente, por outras práticas culturais que provoquem ferimentos nos colmos, como a manipulação mecânica da colheita. Esta espécie bacteriana também pode ser facilmente transportada por ventos e chuvas (COMSTOCK; LENTINI, 2002; TOKESHI, 1997).

Nos testes realizados contra estes patógenos, os melhores resultados, em número de isolados, foram observados para rizobactérias, porém nos testes de antagonismo contra *F. verticillioides*, os resultados foram praticamente idênticos, visto que somente um isolado endofítico não foi capaz de controlar o crescimento deste patógeno. Existem numerosos trabalhos relatando a utilização de microrganismos endofíticos no controle de fitopatógenos (STURZ; MATHESON, 1996), que pode ser resultado de vários fatores, como a produção de antibióticos, promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica (BUCHENAUER, 1998). As bactérias habitantes da rizosfera também possuem características atrativas para aplicações de controle biológico, visto que estas freqüentemente competem por nutrientes e pela ocupação do nicho ecológico e necessitam desenvolver ferramentas para a competição intra e interespecífica, tais como a produção de antibióticos, enzimas degradativas e bacteriolíticas e bacteriocinas, acarretando na inibição de outros microrganismos, dentre eles os patógenos (DONG et al., 2004; PARRET et al., 2003). Portanto, os resultados obtidos são condizentes com a literatura e indicam que os isolados avaliados apresentam potencial para aplicações de biocontrole contra os patógenos testados.

Embora os ensaios tenham sido realizados *in vitro*, seria interessante a condução de testes *in vivo* para avaliar a capacidade destes isolados em promover o crescimento vegetal em condições de campo, visto que estes isolados possuem não só uma característica benéfica para as plantas, mas um conjunto delas. Vale ressaltar que trabalhos conduzidos em condições de campo revelaram que bactérias do gênero *Burkholderia* estão associadas à fixação de nitrogênio de

plantas de café e milho, melhorando o desenvolvimento destas culturas (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2002).

Toda a caracterização fisiológica abordada neste trabalho nos permite concluir que os isolados estudados possuem potencial para exploração industrial e agrícola. Estes resultados também nos revelam diferenças nas análises, de acordo com a origem dos isolados, porém, no geral, as características avaliadas se apresentam nos isolados de ambas as origens, e não foi encontrada uma característica que se fizesse presente somente em isolados endofíticos de raiz ou somente em isolados rizosféricos.

No que se diz respeito à análise molecular, a primeira etapa foi a análise por BOX-PCR. Nesta técnica, os perfis revelados em gel de agarose servem como impressão digital de cada isolado avaliado, são *fingerprints* genômicos correspondentes às regiões conservadas e repetitivas ao longo do genoma de cada isolado, que são discriminatórios para espécies, pois os resultados representam bem análises baseadas na homologia DNA-DNA (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995; De BRUJIN, 1992). Por esta análise chegamos à conclusão de que os isolados estão muito relacionados e que não há diferença, no geral, entre isolados endofíticos de raiz de cana-de-açúcar e os da rizosfera. Apenas 5 isolados ficam agrupados de forma mais distante dos demais, CV4.4.3R1, TH3.3.3R3, CV3.2.3F2, TC4.3.1F2 e TC3.3.3F1, indicando que ao longo do genoma destes existem características que os tornam diferentes de todos os outros 34 isolados avaliados.

Bactérias do gênero *Burkholderia* possuem genomas com 2 a 3 cromossomos, com tamanho de 6 a 9 Mb, além de apresentar capacidade de multireplicação, características que conferem a estas bactérias plasticidade genômica e adaptabilidade metabólica (BENTLEY; PARKHILL, 2004; LESSIE et al., 1996; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; MICHÈ et al., 2001). Assim, as bactérias deste gênero podem colonizar a rizosfera e ambientes endofíticos de uma vasta gama de plantas hospedeiras, bem como apresentar características importantes na relação bactéria-planta, como realizar a fixação de nitrogênio (CABALLERO-MELLADO et al., 2004; CABALLERO-MELLADO et al., 2007; GILLIS et al., 1995; PERIN et al., 2006ab; REIS et al., 2004), ou características que promovam sua competitividade e sucesso na colonização de diferentes ambientes, como a produção de sideróforos (MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2008). Devido a toda esta plasticidade genômica grandes diferenças entre isolados cujas origens são

ambientes tão parecidos, como do ambiente de dentro da raiz da planta e da rizosfera, são muito difíceis de ser encontradas, fato que pode explicar o alto grau de relacionamento entre os isolados observado por BOX-PCR.

Após a análise por BOX-PCR, a técnica de ARDRA, com alvo o gene 16S rDNA, foi utilizada em busca de diferenciação entre os isolados, por meio da formação de ribotipos observados em gel de agarose. Porém, com a técnica de ARDRA, não foi observada diferença entre os isolados avaliados, visto que o isolado CV4.2.1R5 foi o único que apresentou perfil diferente, fato este confirmado pela análise filogenética (16S rDNA e *gyrB*). Entretanto, na análise destas seqüências, este isolado CV4.2.1R5 apresentou similaridade ao isolado CV3.2.3F3. Sendo assim, pode ser sugerido que a técnica de ARDRA não apresentou sensibilidade para análise de variabilidade do gênero *Burkholderia*.

Os dados do seqüenciamento foram analisados através das árvores filogenéticas. Ao analisarmos a primeira árvore filogenética construída com seqüências parciais da região 16S rDNA, foi possível observar a formação de três agrupamentos e, no geral, os isolados se agruparam aleatoriamente, sem interseção do fator lugar de origem. Estes isolados estão mais proximamente agrupados com as espécies do CBC, *B. cepacia*, *B. cenocepacia* e *B. anthina*, com exceção de dois isolados, CV4.2.1R5 e CV3.2.3F3, que se agruparam com a espécie *B. tropica*, uma espécie fixadora de nitrogênio descrita recentemente, associada a plantas de café, cana-de-açúcar e milho (CABALLERO-MELLADO et al., 2004; PERIN et al., 2006b; REIS et al., 2004).

Avaliando o gene *gyrB*, foi possível perceber que novamente os isolados CV4.2.1R5 e CV3.2.3F3 ficam distantes de todos os outros, mas desta vez se agruparam a *B. plantarii*, espécie que foi inicialmente identificada como *Pseudomonas plantarii*, patogênica para a cultura de arroz (AZEGAMI; NISHIYAMA; Tabei, 1988; HIKICHI; OKUNO, T.; FURUSAWA, 1995). Os isolados agruparam-se principalmente com a espécie *B. cepacia*. Nenhum dos agrupamentos foi formado por isolados de somente um local de origem.

Em ambos os genes, muitos isolados não se agruparam de maneira próxima a nenhuma seqüência do banco de dados, porém, para concluir a descoberta de novas espécies do gênero *Burkholderia*, um seqüenciamento minucioso deve ser conduzido. Ao compararmos as análises dos dois genes, é possível observar que alguns agrupamentos se confirmam, enquanto outros não têm relação alguma, por exemplo, os isolados CV4.2.1R5 e CV3.2.3F3 ficaram agrupados com *B. tropica* nas análises com as seqüências do gene 16S rDNA e com *B. plantarii* nas análises com

as seqüências do gene *gyrB*, porém nas duas análises estes isolados ficam distantes de todos os outros 37 isolados. Trabalhos anteriores também mostraram que a topologia de árvores de *gyrB* foi diferenciada da obtida com seqüência do gene 16S rDNA (COENYE et al., 2001), como também de árvores com seqüência do gene *recA* (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000a; VERMIS et al., 2002). Contudo a taxonomia do CBC ainda não está totalmente resolvida (COENYE; VANDAMME, 2003). A presença de diversas linhagens genéticas dentro de cada espécie, tais como em *B. cepacia* e *B. cenocepacia* acrescenta um nível adicional de complexidade taxonômica (BALDWIN et al., 2007).

As técnicas moleculares abordadas apresentaram resultados diferenciados, pois regiões diferentes do genoma bacteriano foram alvo em cada uma das técnicas. Porém, em alguns pontos, elas demonstram o mesmo resultado, como a mistura dos isolados em todas as análises, evidenciando que em nenhum alvo avaliado existe uma diferença capaz de separar isolados endofíticos dos isolados rizosféricos.

A existência de endófitos colonizando plantas e tecidos refletem a habilidade da bactéria de adaptar seletivamente a estes nichos ecológicos específicos (GRAY; SMITH, 2005, HALLMANN et al., 1997b). Conseqüentemente, associações íntimas entre bactérias e plantas hospedeiras podem ser formadas (COMPANT et al., 2005ab; HALLMAN et al., 1997b; KLOEPPER et al., 1999) sem prejudicar a planta (HALLMAN et al., 1997b; KLOEPPER; SCHIPPERS; BAKKER, 1992; KLOEPPER et al., 1999; LODEWYCKX et al., 2002; WHIPPS, 2001). Muitas das bactérias presentes na rizosfera podem também entrar nas raízes e se estabelecer como populações endofíticas, visto que este local (rizosfera) é uma das principais entradas de endófitos para a planta (AZEVEDO, 1998; GRAY; SMITH, 2005; KLOEPPER et al., 1999). Assim, assume-se que muitas comunidades de bactérias endofíticas são o produto do processo de colonização iniciado nas raízes (McLONROY; KLOPPER, 1995a; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; van PEER et al., 1990; WELBAUM et al., 2004), processo levado para o ambiente da planta pela busca de melhores condições para o crescimento. Mas na realidade, as distinções entre bactérias endofíticas e epifíticas (rizoplano ou filoplano) são de natureza apenas didática, não existindo um claro limite entre os grupos e sim um gradiente entre eles, visto que existem populações bacterianas que podem flutuar entre a colonização destes locais, influenciadas pelos fatores ambientais (HALLMANN et al., 1997b). Da mesma forma, isto poderia estar acontecendo com os isolados avaliados neste trabalho. Visto que a rizosfera é

definida como o solo aderente às raízes (KANG; MILLS, 2004), e todos os relatos de rizobactérias podem passar a colonizar as plantas de maneira endofítica, assume-se que os isolados deste trabalho estariam, no momento do isolamento, se movimentando entre estes ambientes, buscando melhores condições para seu crescimento.

Por outro lado *Burkholderia* spp. integrantes do CBC, podem também causar doenças em seres humanos vulneráveis (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005). Um exemplo deste problema em humanos é a Fibrose Cística, onde os pacientes ficam vulneráveis à infecção bacteriana, principalmente à isolados membros do CBC (BLACKBURN et al., 2004). Dessa forma, a posição taxonômica como membros do CBC pode limitar a sua aplicação na agricultura (PERIN et al., 2006a). Assim, juntamente com o aumento de interesse por bactérias deste gênero, surgem também as dúvidas sobre a repercussão de aplicações destas bactérias (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; GOVAN; HUGLES; VANDAMME, 1996; VANDAMME et al., 1997), mesmo sendo observado que as infecções por CBC são muitas vezes secundárias às infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (SPEERT, 2001).

Para avaliar qual a amplitude da emergência de isolados ambientais como causas de infecções clínicas, um método vem sendo muito discriminatório, *Multilocus sequence typing* (MLST), que é uma técnica relativamente nova baseada na análise de vários genes. Ao contrário dos métodos anteriores de tipagem de estirpes do CBC (LIPUMA et al., 2002), a MLST confia na comparação de informações da seqüência de DNA total. Este processo facilita tanto a identificação e a congruência de clones idênticos como também a comparação evolutiva de estirpes estritamente relacionadas. Assim, juntamente com esta técnica, estudos epidemiológicos devem ser realizados a fim de concluir qual o potencial patogênico de isolados de *Burkholderia* biotecnologicamente ativos (MENDES et al., 2007).

A elaboração de produtos naturais que fertilizem as plantas e as protejam contra enfermidades sem contaminação dos solos e sem causar qualquer dano a animais e humanos é o objetivo de todos os pesquisadores. Neste sentido, trabalhar com produtos a partir de metabólitos ativos de espécies do gênero *Burkholderia*, em ausência da célula como tal, permite grandes possibilidades para sua utilização como agente de biocontrole; além disso, constituem uma alternativa eficaz a quimiotóxicos, que são altamente contaminantes e perigosos para saúde (SÁNCHEZ; ORTIZ; HERNANDEZ, 2003).

### 3 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Burkholderia* spp. endofíticos de raiz e da rizosfera apresentam potencial para produção de enzimas do tipo lipases (lipase e esterase);
- Os isolados de *Burkholderia* spp. endofíticos de raiz e da rizosfera apresentam potencial para promoção de crescimento vegetal, avaliado pelas características de fixação de nitrogênio, produção de ácido-indol-acético, produção de sideróforos e solubilização de fosfato inorgânico;
- Os isolados de *Burkholderia* spp. endofíticos de raiz e da rizosfera apresentam potencial para inibição dos patógenos de cana-de-açúcar *Fusarium verticillioides* (Sin.: *F. moniliforme*) e *Xanthomonas albilineans*;
- De acordo com as análises dos genes 16S rDNA e *gyrB*, foi observado que os isolados avaliados fazem parte do complexo *Burkholderia cepacia*, com exceção de apenas 2 isolados (CV4.2.1R5 e CV3.2.3F5);
- De acordo com as técnicas realizadas neste trabalho, não foram encontradas características fenotípicas ou genotípicas que fossem capazes de separar os isolados de *Burkholderia* spp. de acordo com o nicho ocupado no momento do isolamento.





## REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.Jr.; van OVERBEEK, L.S.; van ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J.D. van; VUURDE, J.W.L. van; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.4906-4914, 2002.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGAR-Jr., W.T.; Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, New York, v. 62, p. 45-151, 1998.
- ARTURSSON, V., FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1–10, 2006.
- ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231–237, 2002.
- AZEGAMI, K.; NISHIYAMA, K.; TABELI, H. Infection courts of rice seedlings with *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae*. **Journal of Plant Diseases Protection**, Stuttgart, v. 54, p. 337-341, 1988.
- AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial Biotecnológico. In: Melo, I. S. de.; Azevedo, J. L. de. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 1998. cap. 2, p. 445-461.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, p. 223–233, 2003.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 2000. cap. 3, p 57-93.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; DE ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 40-65, 2000b. Disponível em: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/bip/index.html>>. Acesso em: 10 jul. 2008.

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, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Paris, v. 29, p. 911–922, 1997.

BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; DREVINEK, P.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.; WAINE, D.J.; LIPUMA, J.J.; CHIARINI, L.; DALMASTRI, C.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P.; HONEYBOURNE, D.; MAIDEN, M.C.J.; DOWSON, C.G. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, p. 458-461, 2007.

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

BARELA, J.F. **Seletividade de herbicidas para a cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) afetada pela interação com nematicidas aplicados no plantio**. 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BARRAS, F. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot erwinial. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 201-34, 1994.

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

BARRY, A.L. Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media. In: LORIAN, E. (Ed.). **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991. p. 1-16.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 7-11, 1997.

BASTIAN, F., COHEN, A., PICCOLI, P. LUNA, V., BARALDI, R., BOTTINI, R. Production of indol-3-acetic acid and giberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 204, p. 153-168, 1998.

BASTOS, E. **Cana-de-açúcar, o verde mar de energia**. São Paulo: Ícone, 1987. 130 p.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.

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

BENTLEY, S.D., PARKHILL, J. Comparative genomic structure of prokaryotes. **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto. v. 38, p. 771–791, 2004.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R.A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 215-229, 2005.

BEVER, J.D.; WESTOVER, K.M.; ANTONOVICS, J. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 85, p. 561-573, 1997.

BEVIVINO, A., S. SARROCCO, C. DALMASTRI, S. TABACCHIONI, C. CANTALE, AND L. CHIARINI. 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.

BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 225-231, 2000.

BLACKBURN, L.; BROWNLEE, K.; CONWAY, S.; DENTRON, M. ‘Cepacia syndrome’ with *Burkholderia multivorans*, 9 years after initial colonization. **Journal of Cystic Fibrosis**, Amsterdam, v. 3, p. 133-134, 2004.

BLOEMBERG, G.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by Rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, Philadelphia, v. 4, p. 343–350, 2001.

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

BRAMER, C.O.; VANDAMME, P.; DA SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; STEINBUCHER, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate- accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1709-1713. 2001.

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

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

BUCHENAUER, H. Biological control of soil borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases Protection**, Stuttgart, v. 105, p. 329-348, 1998.

BURBAGE, D.A., SASSER, M.; LUMSDEN, D. A medium selective for *Pseudomonas cepacia*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 706, 1982.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial root of onion bulbs. **Phytopathology**, Lancaster, v. 40, p. 115-117, 1950.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L., PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>- fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 5308-5319, 2007.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9. 1988.

CARTRIGHT, D.K.; CHILTON, W.S.; BENSON, D.M. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 43, p. 211-216, 1995.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMUZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 75-80, 2003.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p. 23-31, 1988.

CHANWAY, C.P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. **Sydowia: An International Journal of Mycology**, Horn, v. 50, p. 149-170, 1998.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.H.; BARRIOS, E.; DE FARIA, S.M.; ELLIOTT, G.N.; SHEU, S.Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

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

CHRISTIANSEN-WENIGER, G. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* through auxin-induced root tumors of rice (*Oryza sativa* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, p. 293-302, 1996.

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

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.W.; LIPUMA, J.J. Minireview: taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3427-3436, 2001.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKAI, E.A. Minireview: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4951-4959, 2005b.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKAI, E.A. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1685-1693, 2005a.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane leaf scald disease**. 2005. Disponível em: <[http://edis.ifas.ufl.edu/SC001#FOOTNOTE\\_2](http://edis.ifas.ufl.edu/SC001#FOOTNOTE_2)>. Acesso em 29 jul. 2008.

COMSTOCK, J.C.; LENTINI, R.S. **Sugarcane mosaic virus disease**. Gainesville: Agronomy Department, Florida Cooperative Extension Service; Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2002.

COOK, R.J. Plant health and the sustainability of agriculture. **American Journal of Alternative Agriculture**, Maryland, v. 3, p. 211-32, 1986.

COPPING, L.G.; MENN, J.J. Biopesticides : a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, London, v. 56, p. 651-676, 2000.

COSTA, J.M., LOPER, J.E. Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 7, p. 440–448, 1994.

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

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIORINI, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 273-284, 1999.

DARLING, P.; CHAN, M.; COX, A.D.; SOKOL, P.A. Siderophore Production by Cystic Fibrosis Isolates of *Burkholderia cepacia*. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 71, p. 491-503, 1998.

De BRUJIN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rizhobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DEACON, J. **The microbial world: biological control: *Bacillus poppilliae***. Institute of cell and molecular biology, The University of Edinburg, 2005. Disponível em: <<http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/control.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2008.

DEMAIN, A.L. Do antibiotics function in nature? **Search**, Durham, v. 11, p 148–151, 1980.

DIARRA, M.S.; LAVOIE, M.C.; JACQUES, M.; DARWISH, I.; DOLENCE, E.K.; DOLENCE, J.A.; GHOSH, A.; GOSH, M.; MILLER, M.J.; MALOUIN, F. Species selectivity of new siderophore-drug conjugates that use specific iron uptake for entry into bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 40, p. 2610-2617, 1996.

DI-FIORE, S.; DEL-GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. *Azospirillum* and related microorganisms. FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; De Zamaroczy, M. (Ed.). **Azospirillum VI and related microorganisms: genetic, physiology and ecology**. New York, 1995, v. 37. p. 169-187.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.L. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa - SPI, 1995, v.1. 60 p.

DONG, Y.H.; ZHANG, X.F.; XU, J.L.; ZHANG, L.H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotova* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 954-960, 2004.

DUFFY, B.K.; DÉFAGO, G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2429–2438, 1999.

DUNBAR, D.M.; BEARD, R.L. Present status of milky disease of Japanese and other Oriental beetles in Connecticut. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 68, p. 453-457, 1975.

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

EL BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 69-78, 1998.

EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acesso em: 25 maio 2008.

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

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. A N<sub>2</sub>-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 285–294, 2002.

FLEMING, W. E. **Biological control of the Japanese beetle**. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, 1968. (Technical Bulletin 1383)

FROMMEL, M.I., NOWAK, J., LAZAROVITS, G. Growth enhancement and development modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, Chicago, v. 96, p. 928-936, 1991.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, Ohio, v. 122, p. 109-119, 2004.

GILKES, N.R.; HENRISSAT, B.; KILLBURN, D.G.; MILLER, R.C.Jr; WARREN, R.A.J. Domains in microbial  $\beta$ -1,4-glycanases: sequence conservation, function and enzymes families. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, p. 303-315, 1991.

GILLIS, M. van TRAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M. HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGER, P.; KERSTENS, K. HEULIN, T. FERNADEZ, M.P. Polyphasic onomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. Nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 274-289, 1995.

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental research letters:** environmentalresearchweb, 2006. Disponível em: <[http://www.iop.org/EJ/article/1748-9326/1/1/014008/erl6\\_1\\_014008.html](http://www.iop.org/EJ/article/1748-9326/1/1/014008/erl6_1_014008.html)>. Acesso em: 30 jun. 2008.

GOLDSTEIN, A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **American Journal of Agricultural Economics**, Milwaukee, v. 1, p. 51-57, 1986.

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

GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.H.; FALSÉN, E.; QUENSEN III, J.F.; TIEDJE, J.M.; VANDAMME, P. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1677-1681, 2004.

GOVAN, J.; HUGHES, J.E.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. **Journal of Medical Microbiology**, Spencers Wood, v. 45, p. 395-407, 1996.

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

GROSS, D.C.; VIDAVER, A.K. Bacteriocins. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Ed.). **Methods in phytobacteriology**. Budapeste: Akademiai Kiado, 1990. p. 245-249.

GRUSAK, M.A., PEARSON, J.N., MARENTES, E. The physiology of micronutrient homeostasis in field crops. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 60, p. 41-56, 1999.

GUERINOT, M.L. Microbial iron transport. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 743-772, 1994.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p. 83-93, 2002.

HALLMANN, J.; BERG, G.; SCHULZ, B. Isolation procedures for endophytic microorganisms. In: SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEBER, T.N. (Ed.). **Microbial Root Endophytes: soil biology**, Berlin: Heidelberg, 2006. Part 3 Methods, p. 299-319.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997b.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, New York, v. 67, p. 597-607, 1975.



HAUBEN, L.; VAUTERIN, L.; MOORE, E.R.; HOSTE, B.; SWINGS, J. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1749-1760, 1999.

HENDRICKSON, H.S. Lipases part A: biotechnology. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 284, p. 146-146, 1997a.

\_\_\_\_\_. Lipases, part B: enzyme characterization and utilization. **Methods in Enzymology**. Amsterdam, v. 286, p. 147-148, 1997b.

HEU, S.; OH, J.; KANG, Y.; RYU, S.; CHO, S.K.; CHO, Y.S.; CHO, M.M. *gly* gene cloning and expression and purification of glycinecin A, bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4105-4110, 2001.

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

HEUNGENS, K.; PARKE, J.L. Zoospore Homing and Infection Events: Effects of the Biocontrol Bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on Two Oomycete Pathogens of Pea (*Pisum sativum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5192-5200, 2000.

HEYNDRIKX, M.; VATERIN, L.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbial Methods**, Amsterdam v. 26, p. 247-259, 1996.

HIKICHI, Y.; OKUNO, T.; FURUSAWA, I. Mode of action of oxolinic acid against bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. III. Infection with *P. glumae* into plumules. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 61, p. 134-136, 1995.

HILL, D. S.; STEIN, J.I.; TORKEWITZ, N.R.; MORSE, A.M.; HOWELL, C.R.; PACHLATKO, J.P.; BECKER, J.O.; LIGON, J.M. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 78-85, 1994.

HILTNER, L. Uber neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berucksichtigung der Grundugungen und Brauche. **Arbeiten der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft**, Berlin, v. 98, p. 59-78, 1904.

HINTON, M.D.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Berlin, v. 129, p. 117-125, 1995.

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

HU, F.P.; YOUNG, J.M. Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 263-271, 1998.

HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B., van MONTAGU, M., KELLEMBERGER, E. Root colonizing and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in glasses. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, p. 913-1923, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção agrícola**. Disponível em: < <http://ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=265>>. Acesso em: 20 jun. 2008.

JABRANE, A.; SABRI, A.; COMPÈRE, P.; JACQUES, P.; VANDENBERGUE, I.; van BEEUMEN, J.; THONART, P. Characterization of serracin, a phagetail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the first blight pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 5704-5710, 2002.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Review: Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; SCHNEIDINGER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJAKSTRA, B.W.; SCHIMOSSEKE, K.; ZONTA, A.; REETZ, M.T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, The Netherlands, v.3, p. 3-12, 1997.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 197-209, 2000.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 77–119, 1998.

JESUS, M.F.C.P; BRANCO, R.N.; SANT'ANA Jr., G.L.; FREIRE, D.M.G; SILVA Jr., J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 16, 1999.

JUMPPONEN, A.; MATTSON, K.G.; TRAPPE, J.M. Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: Interactions with soil nitrogen and organic matter. **Mycorrhiza**, New York, v. 7, p. 261–265, 1998.

KANG, S.; MILLS, A.L. SOIL Bacterial Community structure changes following disturbance of the overlying plant community. **Soil Science**, New Brunswick, v. 69, p. 55-65, 2004.

KANG, Y.W.; CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M.A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3939-3947, 1998.

KAZLAUKAS, R.J. BORNSCHEUER, U.T. Biotransformation with lipases. In: KELLY, D.R. (Ed.). **Biotechnology**. New York: Wiley Weinheim VCH, 1998. p. 37-191.

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

KHAN M. S.; ZAIDI A.; WANI P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.

KLOEPPER, J.W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G.W. MURPHY, J.F.; SIKORA, E.; FERNANDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 28, p. 21-26, 1999.

KLOEPPER, J.W.; SCHIPPERS, B.; BAKKER, P.A.H.M. Proposed elimination of the term endorhizosphere. **Phytopathology**, Lancaster, v. 82, p. 726-727, 1992.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Baltimore, v. 5, p. 408, 1995.

KROHN, K.; BAHRAMSARI, R.; FLÖRKE, U.; LUDEWIG, K.; KLICHE-SPORY, C.; MICHEL, A.; AUST, H.J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. **Phytochemistry**, New York, v. 45, p. 313-320, 1997a.

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

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.

LAVERMICOCCA, P.; LONIGRO, S.L.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; VISCONTI, A. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1403-1407, 2002.

LEE, S.; RETH, A.; MELETZUS, D.; SERVILHA, M.; KENNEDY, C. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, p. 7088-7091, 2000.

LEINHOS; V.; NAECK, O. Biosynthesis of auxins by phosphate solubilizing rhizobacteria from wheat (*Triticum aestivum*) and rye (*Secale cereale*). **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 149, p. 31-35, 1994.

LESSIE, G.L.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B.D.; Devereux, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 144, p. 117–128, 1996.

LIGON, J.M.; HILL, D.S.; HAMMER, P.E.; TORKEWITZ, N.R.; HANS-JOACHIM, D.H.; VAN PÉE, K.H. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Management Science**, London, v. 56, p. 688–695, 2000.

LIPUMA, J.J.; SPILKER, T.; COENYE, T.; GONZALEZ, C.F. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. **The Lancet**, Amsterdam, v. 359, p. 2002-2003, 2002.

LIU, Z.; PILLAY, V., NOWARK, J., ZHY-DE WEI. In vitro culture of watermelon and cataloupe with and without beneficial bacterium. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 402, p. 58-60, 1995.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; DER LELIE, D. Endophytic Bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOPER, J.E.; HENKELS, M.D. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 5357-5363, 1999.

LUPSKI, J.R. Molecular epidemiology and its clinical application. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 270, p. 1323-1329, 1993.

MACEDO. I.C. **A energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade**. São Paulo: Berlendis and Vertecchia, 2007.

MAHENTHIRALINGAM, E., BISCHOF, J.; BYRNE, S.K.; RADOMSKI, C.; DAVIES, J.E.; AV-GAY, Y.; VANDAMME, P. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3165–3173, 2000a.

MAHENTHIRALINGAM, E., URBAN, T.A.; GOLDBERG, J.B. The multifarious multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 144–156, 2005.

- MAHENTHIRALINGAM, E.; VANDAMME, P.; CAMPBELL, M.E.; HENRY, D.A.; GRAVELLE, A.M.; WONG, L.T.; DAVIDSON, A.G.; WILCOX, P.G.; NAKIELNA, B.; SPEERT, D.P. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 33, p. 1469–1475, 2001a.
- MARCON, J. **Efeito de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre comunidades bacterianas**. 2007. 96 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MARIANO, R.L.R., Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.1, p.369-409, 1993.
- MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; DÍAZ, R.; PEÑA-CABRIALES, J.J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; DUNN, M.F.; CABALLERO-MELLADO, J. Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 4574-4579, 2008.
- McLONROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 895-901, 1995a.
- MELO, J.; TOCZYSKL, D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. **Current Opinion in Cell Biology**, Amsterdam, v. 14, P. 237-245, 2002.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L.C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO A.M. (Ed.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Ed. Universitária UFPE, 2007. p. 129-140.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, 2007.
- MICHÈ, L.; FAURE, D.; BLOT, M.; CABANNE-GIULI, E.; BALANDREAU, J. Detection and activity of insertion sequences in environmental strains of *Burkholderia*. **Environmental Microbiology**, New York, v. 3, p. 766–773, 2001.
- MILA, I., SCALBERT, A., EXPERT, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. **Phytochemistry**, New York, v. 42, p. 1551–1555, 1996.
- MILLER, F.; UETZ, S. Evaluating biorational pesticides for controlling arthropod pests and their phytotoxic effects on greenhouse crops. **HortTechnology**, Beltsville, v. 8, p. 185-192, 1998.
- MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 808-811, 1990.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; CELLL, F. D.; MENGONI. A.; SFALANGA, A.; VILANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI. R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 105-114, 2003.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002, 626 p.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 30, p. 948-50, 2001.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 127-141, 1998.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Biological nitrogen fixation: research challenges – a review of research grants funded by the U.S. Agency for International Development**. Washington, D.C.: National Academic Press, 1994. 59 p.

NEILANDS, J.B. Microbial iron compounds. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 50, p. 715-731, 1981.

\_\_\_\_\_. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v. 270, p. 26723–26726, 1995.

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

O’SULLIVAN, D.J.; O’GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 56, p. 662-676, 1992.

O’SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, p. 8-11, 2005.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

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

PAITAN, Y.; BOULTON, N.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E.; ORR, E. Molecular analysis of the *gyrB* gene from *Myxococcus xanthus*. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 144, p. 1641-1647, 1998.

PALLERONI, N. J. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. **Antonie Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 72, p. 3-19, 1997.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 225-258, 2001.

PARKE, J.L.; RAND, R.E. Biological control of *Pythium* damping off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. **Plant Disease**, St. Paul v. 75, p. 987-992, 1991.

PARRET, A.H.A.; SCHOOF, G.; PROOST, R.; DE MOT, R. Plant lectin-like bacteriocin from rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 185, p. 897-908, 2003.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A. KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agrônoma Ceres, 1995. cap. 19, p.343-364.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência sistêmica. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agrônoma Ceres, 1995. v. 1, cap., 22, p. 417-454.

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

PERIN, L. MARTÍNES-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLES, R.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P. CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3103-3110, 2006a.

PERIN, L. MARTÍNES-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J.I.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1931-1937, 2006b.

PHILLIPS, D.A., FERRIS, H., COOK, D.R., STRONG, D.R. Molecular control points in rhizosphere food webs. **Ecology**, Brooklyn, v. 84, p. 816-826, 2003.

PING, L.; BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 263-266, 2004.

PITELLI, R. A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informações Agropecuárias**, Belo Horizonte, v. 11, p. 16-27, 1985.

PRADHAN, S.; SHUKLA, S.S.; DORRIS, K.L. Removal of nickel from aqueous solutions using crab shells. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. B125, p. 201-204, 2005.

PUGSLEY, A.P.; OUDEGA, B. Methods for studying colicins and their plasmids. In: Hardy, K.G. (Ed.), **Plasmids: a Practical Approach**, Oxford: IRL Press, Oxford, p. 105-161, 1987.

PURNOMO, E., MURSYID, A., SYARWANI, M., JUMBERI, A., HASHIDOKO, Y., HASEGAWA, T., HONMA, S.; OSAKI, M. Phosphorus solubilizing microorganisms in the rhizosphere of local rice varieties grown without fertilizer on acid sulfate soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, Osaki, v. 51, p. 679-681, 2005.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; De BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L.; van ELSAS, J.D., and de BRUIJN, F.J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 1-27.

RAID, R.N. **Pokkah boeng disease of sugarcane**. Gainesville: University of Florida, 1998. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/SC004>>. Acesso em: 18 jun. 2008.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J.J.; TIEDJE, J.M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1193-1201, 2005.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

RAUPACH, G.S.; KLOPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 1158-1164, 1998.

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

REED, G. **Enzymes in food processing**. 2th ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573 p.

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

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. And other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 29-54, 1998.



REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogenfixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

RENGEL, Z.; BATTEN, G.D.; CROWLEY, D.E. Agronomic approaches for improving the micronutrient density in edible portions of field crops. **Field Crop Research**, Amsterdam, v. 60, p. 27-40, 1999.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FANQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). **Inter-relação: fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 429-448.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D.V. Minireview: molecular microbial ecology. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 135-47, 1997.

ROSSETTO, P.B. **Interações entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2008. 148 p. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

ROUMAS, E.N. **Produção de celulasas e fusão de protoplastos em *Hemicula* sp.** 1988. 168 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

SALLES, J. F., van VEEN, J.A.; van ELSAS, J.D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

SALLES, J.F. ***Burkholderia* community structure in soils under different agricultural management**. 2005. 144 p. (Ph.D. thesis) - Leiden University, Institute of Biology Leiden, 2005.

SÁNCHEZ, L.; ORTIZ, S.; HERNANDEZ, A. Obtención de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* y optimización del medio de cultivo para su producción. **Revista de Salud Animal**, San José de las Lajas Habana, v. 25, p. 27-33, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the Natural Academic Sciences of United States of America**, Stanford, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHROTH, M.N.; HANCOOK, G.H. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria science. **Soil Biology and Biochemistry**, Paris, v. 24, p. 539-542, 1995.

SCHÜLEIN, M. Protein engineering of celluloses. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1543, p. 239-252, 2000.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 996–1004, 2002.

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

SEIFERT, K.A.; AOKI, T.; BAAYEN, R.P.; BRAYFORD, D.; BURGESS, L.W.; CHULZE, S.; GAMS, W.; GEISER, D.; GUYTER, J.; LESLIE, J.F.; LOGRIECO, A.; MARASAS, W.F.O.; NIRENBERG, H.I.; O'DONNELL, K.; RHEEDER, J.; SAMUELS, G.J.; SUMMERELL, B.A.; THRANE, U.; WAALWIJK, C. Mycological research news. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. DOI: 10.1017/ s095375620323820X, **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 641-644, 2003.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A.V.; VANDAMME, P.; BARKA, E.A.; SALLES, J.F.; van ELSAS, J.D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B.R. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1187-1192, 2005.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 19, p. 627-662, 2001.

SIDDIQUI, Z. A. PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: The Netherlands, 2005. p. 111–142.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 23, p.15-22, 1957.

SILVA, D.M. **Bactérias diazotróficas na cultura do arroz irrigado**. 2002. 161 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do sul, Santa Maria, 2002.

SILVA-STENICO, M.E.; PACHECO, F.T.H.; RODRIGUES, J.L.M.; CARRILHO, E.; Tsai, S.M. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 60, p. 429-436, 2005.

SPEERT, D.P. Understanding *Burkholderia cepacia*: epidemiology, genomovars, and virulence. **Infections in Medicine**, New York, v. 18, p. 49-56, 2001.

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

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

STAHL, D.A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In: HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McLNERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WATER, M.W. **Manual of environmental microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1997. p.102-114.

STEEL R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. New York: McGraw-Hill, 1980, p. 633, 1980.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a freeliving nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, p.487-506, 2000.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 535-534, 2003.

STURZ, A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, p. 157-263, 1995.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

STURZ, A.V.; MATHESON, B.G. Population of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia* – induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 184, p.265-271, 1996.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 596-1599, 2007.

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

TOKESHI, H. Doenças de cana-de-açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. p. 207-225.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - ÚNICA. Disponível em: <<http://www.usinabatatais.com.br/admin/discovirtual/primeiraestimativasafra2008-09>>. Acesso em: 25 jul. 2008.

van ESLAS, J.D.; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. Microbial and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 133-154, 1998.

van LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

van PEER, R.; PUNTE, H.L.M.; WEGER, L.A.; SCHIPPERS, B. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, p. 2462-2470, 1990.

van PELT, C.; VERDUIN, C.M.; GOESSENS, W.H.F.; VOS, M C.; TÜMMLER, B.; SEGONDS, C.; REUBSAET, F.; VERBRUGH, H.; van BELKUM, A. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 2158-2164, 1999.

van TRAN, V.; BERGE, O.; NGO, K.S.; 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 Vietnam. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, p. 273-284, 2000.

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

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 25, p. 507-512, 2002.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTER, K.; GOVAN, J.R.W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 1188-1200, 1997.

VANEECHOUTTE, M.; ROSSAU, R.; DeVOS, P.; GILLIS, M.; JANSSENS, D.; PAEPE, N.; DeROUCK, A.; FIERS, T.; CLAEYS, G.; KERSTERS, K. Rapid identification of bacteria in the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 93, p. 227-234, 1992.

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

- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 91, p. 127-141, 2001.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DEBRUIJN, F.J. LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New Jersey, v. 5, p. 25-40, 1994.
- WAKAYAMA, S.; ISHIKAWA, F.; OISHI, K. Mycocerein, a novel antifungal peptide antibiotic produced by *Bacillus cereus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 26, p. 939-940, 1984.
- WATANABLE, K.; NELSON, J.S.; SHIGEAKI, H.; KASAI, H. ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 344-345, 2001.
- WEBER, O.B.; CRUZ, L.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 201- 205, 2001.
- WELBAUM, G.; STURZ, A.V.; DONG, Z.; NOWAK, J. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 23, p. 175-193, 2004.
- 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: VCH, 1994. chap 1, p. 1-18.
- WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 52, p. 487-511, 2001.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.
- WOOD, P.J.; ERFLE, D.; TEATHER, R.M. Use of complex formation between congo red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v. 160, p. 59-74, 1988.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I., HOTTA, H., HASHIMOTO, Y., EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, p. 1251-1275, 1992.
- YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. PCR Amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1104-1109, 1995.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 813-819, 1998.

ZAPATA, F.; AXMANN, H. <sup>32</sup>P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Berlin, v. 41, p. 189-195. 1995.

ZEHNDER, G.; KLOEPPER, J.; TUZUN, S.; YAO, C.; WEI, G. Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria-induced plant resistance. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Sj. Tiemersma, v. 83, p. 81-85, 1997.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 50, p. 743-749, 2000.