



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

MARIA IDALINE PESSOA CAVALCANTI

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MILHO
CULTIVADO NO SEMIÁRIDO OBTIDAS POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE
ISOLAMENTO**

**CAMPINA GRANDE-PB
2016**

MARIA IDALINE PESSOA CAVALCANTI

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM MILHO
CULTIVADO NO SEMIÁRIDO OBTIDAS POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE
ISOLAMENTO**

Trabalho de Conclusão de Curso ou Dissertação
ou Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Agrárias da
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Agricultura Familiar e
Sustentabilidade

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes
Júnior

**CAMPINA GRANDE–PB
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

C376s Cavalcanti, Maria Idaline Pessoa.
Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no semiárido obtidas por diferentes estratégias de isolamento [manuscrito] / Maria Idaline Pessoa Cavalcanti. - 2016.
109 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2016.

"Orientação: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Zea mays L. 3. Milho.
4. Promoção de crescimento. I. Título.

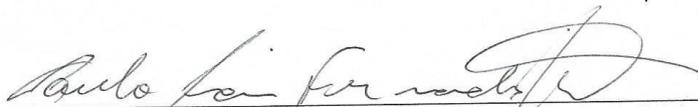
21 . ed. CDD 633.15

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM
MILHO CULTIVADO NO SEMIÁRIDO OBTIDAS POR DIFERENTES
ESTRATÉGIAS DE ISOLAMENTO**

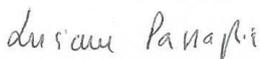
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências do componente curricular da disciplina de seminário da pesquisa / Área de Concentração: Agricultura Familiar e Sustentabilidade

Aprovada em 01 de Abril de 2016

Banca examinadora



Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior (D.Sc., Ciência de Solo)
Embrapa Semiárido
Orientador



Prof. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia (D.Sc., Genética)
UFRGS
Examinadora



Prof. Dra. Élide Barbosa Corrêa (D.Sc., Proteção de Plantas)
UEPB
Examinadora

Aos meus pais **João da Silva Cavalcanti** e **Ivonete Pessoa Cavalcanti**, fontes de sabedoria, dedicação e confiança, pelo apoio psicológico e moral estando sempre juntos me incentivando e não deixando que desistisse em nenhum momento. A **Socorro Dias** (*in memoriam*), minha tia de coração, que me ajudou muito desde o início da minha jornada acadêmica.

DEDICÓ

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado sabedoria, paciência por sempre me encorajado durante esse tempo. Obrigado Deus por todas as bênçãos concedidas e por me sustentar nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, pela oportunidade, orientação ao longo de todo o mestrado.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, a Embrapa Algodão pela oportunidade concedida e a Embrapa Semiárido por fornecer a estrutura para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida até o final do curso.

A minha irmã Juliana Pessoa juntamente com meu cunhado Raumiery, que também contribuíram ajudando sempre que precisei. Ao meu sobrinho Antonio Neto, alegria da minha vida.

Um agradecimento especial ao meu namorado, Adjamy Vilar, pelo carinho e incentivo durante toda a caminhada, mas principalmente pela paciência, apoio e compreensão nos momentos de dificuldade.

A minha família, que sempre esteve presente, em especial a minha tia Iolanda, Gilberto, Marcelo, madrinha Marluce, tia Luciana, tio Gilmar e minha prima Beatriz.

À Professora Lindete Miria(UNEB) pelos ensinamentos que foram importantes para a minha formação pessoal e profissional.

À Indra Elena pelos ensinamentos, conselhos, orientações e paciência, durante todo o desenvolvimento deste trabalho

Aos funcionários da Embrapa Semiárido, Herbert Mouse e seu Luiz Antônio por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

Às amigas que fiz em Petrolina Ítala, Dalila, Layane, Tainá, Jéssica Lima, Jéssica Fernanda Lucivânia e Rejane, pelos momentos de trabalho, alegria, colaboração e companheirismo que me ajudaram a suportar a falta da minha família e vencer mais essa etapa!

À minha turma do mestrado em Ciências Agrárias, principalmente as princesinhas das agrárias, as quais dividimos diariamente as aflições, nervosismos e alegrias.

Aos amigos de sempre, que mesmo longe se mantiveram presente na minha rotina diária: Lieska, Yanna, Jaqueline, Regina, Wennia, Heitor, Luiz Cláudio(Mancha), Paulo Alexandre, Cristiany.

A todos que não foram mencionados, mas que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional

Muito Obrigada!

RESUMO

CAVALCANTI, MARIA IDALINE PESSOA M.Sc., Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, Abril de 2016. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no Semiárido obtidas por diferentes estratégias de isolamento** Campina Grande, PB, 2016. 106 p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

Poucas informações foram até hoje levantadas a respeito da diversidade e do potencial biotecnológico dos micro-organismos do solo no Semiárido, principalmente daqueles associados a gramíneas. O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal forma de entrada de nitrogênio (N) em ecossistemas naturais e é intermediado por micro-organismos diazotróficos simbióticos ou de vida livre. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar, por meio de métodos bioquímicos e genéticos, uma coleção de bactérias associadas ao milho (*Zea mays*) presentes em solos do Semiárido, utilizando três diferentes abordagens metodológicas: (i) diretamente em meio semissólido, (ii) diretamente em meio sólido e (iii) utilizando uma leguminosa como planta isca para a obtenção dos rizóbios associados ao milho. Foram obtidos 405 isolados bacterianos os quais foram caracterizados morfológica e genótipicamente. Com relação ao potencial biotecnológico, 92% dos isolados produziram ácido indol-3-acético (AIA), 30% solubilizaram fosfato de cálcio e 19% produziram sideróforos. Foi confirmada atividade antagonista ao fungo *Fusarium oxysporum* nas três metodologias estudadas. A análise de restrição (ARDRA) mostrou que o local de origem dos isolados foi fator determinante para o agrupamento das bactérias. Um total de 79 isolados foram selecionados para os ensaios de promoção de crescimento em vasos. Os isolados DBG10 e PBG82 proporcionam maiores benefícios às plantas quando inoculados nas sementes de milho testadas em experimento de vasos, sendo mais eficiente com relação a FBN, para a cultivar de milho BRS Gorutuba.

Palavras chave: Fixação biológica de nitrogênio, promoção de crescimento, inoculante, diversidade.

ABSTRACT

CAVALCANTI, MARIA IDALINE PESSOA M.Sc., State University of Paraíba / Embrapa Cotton, April 2016. **Selection of plant growth promoting bacteria in maize grown in Semi-Rid region obtained by different isolation strategies** Campina Grande, PB, 2016. 110p. Dissertation (Graduated Studies in Agricultural Sciences). Advisor: Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

Little information have now been raised about the diversity and biotechnological potential of soil microorganisms in the semiarid region, especially those associated with grasses. The biological nitrogen fixation process (BNF) is the main form of nitrogen input (N) natural ecosystems and is brokered by diazotrophic symbiotic microorganisms or living free. The aim of this study was to isolate and characterize, through biochemical and genetic methods, a collection of bacteria associated with maize (*Zea mays*) present in semi-arid soils using three different methodological approaches: (i) directly semisolid medium, (ii) directly on solid medium and (iii) using a leguminous plant as bait for obtaining the rhizobia associated with corn. 405 bacterial isolates were obtained which were characterized morphologically and genotypically. With respect to the biotechnological potential 92% of the isolates produced indole-3-acetic acid (IAA), 30% solubilized calcium phosphate and 19% siderophores produced. It was confirmed antagonist activity to the fungus *Fusarium oxysporum* in the three methods studied. The restriction analysis (ARDRA) showed that the place of origin of the isolates was a determining factor for the group of bacteria. A total of 79 isolates were selected for growth promotion test vessels. The DBG10 and PBG82 isolated provide greater benefits to plants when inoculated in corn seeds tested in experimental vessels, being more efficient with respect to FBN, to cultivate corn BRS Gorutuba.

Keywords: biological nitrogen fixation, growth promotion, inoculant, diversity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de isolados bacterianos totais em plantas de milho coletadas em Mandacaru-BA e Bebedouro-PE.....	44
Tabela 2: Isolados selecionados após caracterização molecular e capacidade de produzir compostos indólicos em bactérias isoladas de milho em solos do Semiárido.....	49
Tabela 3: Produção de AIA de bactérias diazotróficas isoladas de milho, na presença e ausência de L-triptofano.(Metodologia 1).....	60
Tabela 4: Produção de AIA de bactérias diazotróficas isoladas de milho, na presença e ausência de L-triptofano.(Metodologia 2).....	63
Tabela 5: Produção de AIA de bactérias diazotróficas isoladas de milho, na presença e ausência de triptofano.(Metodologia 3).....	65
Tabela 6: Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio de bactérias isoladas de plantas de milho no Semiárido. Metodologia 1	67
Tabela 7: Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio de bactérias isoladas de plantas de milho no Semiárido. Metodologia 2.....	69
Tabela 8: Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio de bactérias isoladas de plantas de milho no Semiárido. Metodologia 3.....	70
Tabela 9: Quantificação da produção de Sideróforos de bactérias isoladas de milho em solos do Semiárido.....	72
Tabela 10: Quantificação de proteínas totais das amostras de culturas bacterianas crescidas em meio BMGM.....	76
Tabela 11: Promoção de crescimento de bactérias de milho utilizando-feijão caupi como planta isca.....	79
Tabela 12: Promoção de Crescimento de Bactérias Isoladas de milho no Semiárido, utilizando três metodologias diferentes.....	83

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1. Esquematização das abordagens metodológicas utilizadas para a obtenção dos isolados de bactérias diazotróficas do milho.*= metodologias utilizadas. Fonte: Paulo Ivan Fernandes Júnior.....	33
Figura 2: Amplificação do gene <i>nifH</i> com os iniciadores PolF e PolR na primeira reação e <i>nifHF</i> e <i>nifHR</i> (nested) de isolados de bactérias da metodologia 2.....	47
Figura 3: Amplificação do gene <i>nifH</i> e/ou do gene <i>nodC</i> em isolados selecionados da metodologia 3,no método Duplex-PCR.	48
Figura 4: Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de milho da metodologia 1,por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição <i>HinfI</i> , <i>Hha</i> e <i>Msp</i>	51
Figura 5: Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de milho da metodologia 2, por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição <i>HinfI</i> , <i>Hha</i> e <i>Msp</i>	53
Figura 6: Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de milho da metodologia 3,por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição <i>HinfI</i> , <i>Hha</i> e <i>Msp</i>	56
Figura 7: Halo de solubilização e crescimento das colônias de bactérias isoladas de plantas de milho referentes as metodologias 1 e 2.....	68
Figura 8: Distribuição dos isolados obtidos por meio das três metodologias distintas com relação ao desempenho no ensaio de antagonismo “in vitro” contra o patógeno do milho <i>Fusarium oxysporum</i>	73
Figura 9: Ensaio de Antagonismo contra o fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	74
Figura 10– Curva de calibração padrão da concentração de proteína (BSA) em mg/mL no meio semi-sólido BMGM; Absorbância medida à 750nm.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA- Ácido indol áctico

ARDRA-Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado

ATP- Adenosina trifosfato

Al-Alumínio

PCR-Reação de polimerase em cadeia

NaCl-Cloreto de Sódio

ADE-Água destilada estéril

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DO-Densidade ótica

CAS-Cromo Azurol

NaOH- Hidróxido de Sódio

BSA- Albumina de Soro Bovino

mm milímetro

mg miligrama

mg L-1 miligrama por litro

mL mililitro

mol L-1 mol por litro

µg mg micrograma por miligrama

µL microlitro

µm micrômetro

µg mL micrograma por mililitro

nm nanômetro

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Semiárido Brasileiro.....	17
3.2 A Cultura do Milho (Zea mays L.)	18
3.3 Fixação Biológica do Nitrogênio em Gramínea	19
3.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	22
3.4.1 Produção de Compostos Indólicos (Ácido Indol -3-acético-AIA)	23
3.4.2 Solubilização de Fosfato.....	23
3.4.3 Produção de Sideróforos.....	24
3.5 Antagonismo a patógenos	25
3.6 A importância de técnicas moleculares nos estudos de diversidade.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Área experimental e coleta das amostras.....	29
4.1.2 Isolamento das Bactérias.....	29
4.1.3 Metodologia 1: Isolamento das bactérias em meio sólido.....	31
4.1.4 Metodologia 2: Isolamento dos microrganismos diazotróficos em meio semissólido	31
4.1.5 Metodologia 3: Obtenção dos isolados utilizando leguminosas como plantas isca.....	31
4.2 Caracterização fenotípica das colônias	34
4.3 Caracterizações moleculares dos isolados	34
4.3.1 Extração de DNA.....	34
4.3.2 Amplificação da presença do gene nifH	34
4.3.3 – Duplex PCR para a amplificação simultânea dos genes nifH e nodC das bactérias isoladas de nódulos.....	36
4.3.4 – Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).....	36
4.4 Mecanismos de Promoção do Crescimento Vegetal	37
4.4.1 – Produção de Ácido Indol Acético (AIA)	37

4.4.2 – Solubilização de Tri-fosfato de Cálcio	38
4.4.3 – Produção de Sideróforos	38
4.4.4 – Quantificação de Proteínas em Meio Semissólido.....	39
4.4.5 Ensaio de Antagonismo a <i>Fusarium oxysporum</i> f.s.p	39
4.5 Experimentos em vasos	40
4.5.1 – Eficiência Simbiótica de Rizóbios de Feijão-Caupi (metodologia 3)	40
4.5.2 – Capacidade de Promoção do Crescimento em Plantas de Milho	41
4.6 Análise dos Dados	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Obtenção das coleções e caracterização cultural das bactérias.....	43
5.2 Caracterização molecular dos isolados	46
5.2.1 – Amplificação de fragmentos dos genes simbióticos como ferramentas para seleção prévia dos isolados	46
5.3 Variabilidade genética das bactérias por meio da técnica de Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).....	49
5.4 Avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal “in vitro”.....	58
5.4.1 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	58
5.4.2 Solubilização de Tri-fosfato de Cálcio.....	67
5.4.3 Produção de Sideróforos	71
5.4.4 – Antagonismo a <i>Fusarium oxysporum</i>	72
5.4.5 Determinação do Teor de Proteínas em Meio Semissólido	74
5.5 Ensaio de Promoção do Crescimento Vegetal.....	77
5.5.1 – Eficiência Simbiótica de Rizóbios de Feijão-Caupi (Metodologia 3)	77
5.5.2 – Capacidade de Promoção do Crescimento em Plantas de Milho.....	81
6. CONCLUSÕES:	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
8. ANEXOS	104

1. INTRODUÇÃO

O Semiárido brasileiro é considerado a região semiárida mais populosa do mundo, com aproximadamente 23 milhões de habitantes (IBGE 2010). É caracterizado por apresentar baixos índices pluviométricos, temperaturas elevadas e regime de chuvas irregularmente distribuídas no tempo e espaço, o que proporciona longos períodos de estiagem (QUEIROZ, 2009).

O milho (*Zea mays*) é um cereal originário da América Central de grande importância na indústria, no consumo humano e animal, se tornando grande alternativa para agricultores familiares. São plantas que requerem grandes quantidades de fertilizantes químicos, como o Nitrogênio, para atingir uma boa produção. O uso indiscriminado de fertilizantes tem ocasionado sérios problemas ao meio ambiente, levando à degradação dos recursos naturais e afetando negativamente diversas funções ecológicas do solo (SHAHZAD et al., 2013)

As bactérias promotoras de crescimento pertencem a um grupo benéfico e heterogêneo de micro-organismos que podem ser encontrados na rizosfera, na superfície da raiz ou associado a ela, e são capazes de melhorar o crescimento de plantas e protegendo-os de doenças e estresses abióticos (DIMKPA et al, 2009; GROVER et al, 2011; GLICK, 2012)

O complexo enzimático nitrogenase é responsável pela transformação do nitrogênio atmosférico em nitrogênio amoniacal prontamente assimilável pelas plantas. A interação entre bactérias diazotróficas e gramíneas não ocorre da mesma maneira que a interação entre rizóbio e leguminosas, onde se formam os nódulos característicos da interação (FIGUEIREDO et al., 2010).

O estudo de diversidade de bactérias associados a gramíneas, pode revelar grandes associações, com possibilidade de exploração para produção de biofertilizantes que venham substituir parcialmente a utilização de fertilizantes químicos. Para o milho, é bem documentada a sua capacidade de estabelecer relações rizosféricas e/ou endofíticas com promoção do crescimento das plantas com vários gêneros bacterianos (CHELIUS e TRIPLETT, 2000; CABALLEROMELLADO et al., 2004). No Brasil, o isolamento e seleção de estirpes de *Azospirillum brasilense* eficientes em promover o crescimento de milho por HUNGRIA et al., (2010), permitiu o registro e comercialização do primeiro produto inoculante para esta cultura. Além desses gêneros, existe grande interesse em estudar e utilizar rizóbios isolados de nódulos de

leguminosas como promotores de crescimento em inúmeras gramíneas. Resultados positivos na promoção de crescimento com a inoculação de rizóbios já foram obtidos em arroz (OSÓRIO FILHO, 2009; YANNI E DAZZO, 2010; BHATTACHARJEE et al., 2012) e em milho, porém em menor número de trabalhos (GUTIERREZ-ZAMORA e ROMERO, 2001, BÉCQUER et al., 2011).

Devido ao número de respostas das plantas de milho à inoculação com bactérias promotoras de crescimento, torna-se necessária a identificação das melhores associações entre bactérias diazotróficas e genótipos de milho com vistas a se obter o maior incremento no crescimento das plantas e o maior aproveitamento dos nutrientes. Ainda é pouco estudada essa interação, especialmente a de rizóbios, eficientes na fixação simbiótica de N em leguminosas, com plantas não-leguminosas (MISHRA, 2006)

A utilização de tecnologias moleculares tem sido intensivamente aplicada em todos os ramos da microbiologia. O isolamento do DNA bacteriano deve ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo, especialmente quando a análise de muitas espécies e linhagens é necessária (NOGUEIRA et al., 2004). O conhecimento e a caracterização destas bactérias fornecem subsídios para o enriquecimento das informações de sua interação com diferentes genótipos do milho, contribuindo assim como uma estratégia que beneficia tanto o manejo quanto a produção da cultura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar uma coleção de bactérias obtidas de colmo, raiz e solo de duas cultivares de milho em solos do semiárido, utilizando três abordagens metodológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar diversidade e os mecanismos de promoção de crescimento de bactérias diazotróficas isoladas de milho cultivado em áreas do Semiárido
- Indicar isolados potenciais para a utilização como inoculantes para o milho em condições de campo a partir de ensaios preliminares de promoção do crescimento

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Semiárido Brasileiro

A região semiárida abrange cerca de 900 mil km², correspondendo aproximadamente a 54% da região Nordeste e 11% do território brasileiro, compreende áreas dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, o sudoeste do Piauí, partes do interior da Bahia e do norte de Minas Gerais (ANDRADE et al., 2005).

A Região Semiárida é caracterizada por altas temperaturas, resultando em altas taxas de evapotranspiração, com ocorrência de longos períodos de estiagem e índices de precipitação pluviométrica anual, igual ou inferior, a 800 mm. Os solos, em sua maioria possuem pouca profundidade e reduzida capacidade de retenção de água, limitando consequentemente o seu potencial produtivo. (ARAÚJO FILHO, 2002).

Devido às características socioeconômicas da região, grande parte da população local está vinculada a atividades agrícolas e a pecuária. Nesta região a agricultura básica é praticada de forma tradicional, em geral, sem práticas de manejo adequadas, onde o corte e a queima da vegetação é um hábito comum. Além da pressão antrópica causada pelo desmatamento, extração excessiva de produtos florestais, uso intensivo do solo e os fatores climáticos como as recorrentes e prolongadas secas, têm levado a uma rápida degradação ambiental ocasionando perda de diversidade nesses locais, tornando a Caatinga um dos ecossistemas brasileiros mais ameaçados (SILVA et al., 2010; SÁ et al., 2010).

Nessa zona climática está inserido o bioma Caatinga, possuindo uma rica diversidade biológica. As populações microbianas que habitam os solos deste sistema são capazes de desenvolver estratégias de sobrevivência diante de condições de estresses bióticos e abióticos, sendo as bactérias representantes importantes, desempenhando funções essenciais para a manutenção dos sistemas ecológicos neste bioma (BRASIL 2005; SILVA et al., 2010).

O desenvolvimento de tecnologias para a produção agrícola no Semiárido deve-se buscar estratégias para reduzir os efeitos da baixa disponibilidade hídrica nos sistemas produtivos, principalmente os de base familiar, priorizando a obtenção de isolados bacterianos que possam agir como promotores de crescimento para o milho na região Nordeste.

Dentre esses micro-organismos, as bactérias diazotróficas são um dos grupos mais estudados e conhecidos como eficientes na redução dos estresses ambientais sobre as plantas hospedeira.

3.2 A Cultura do Milho (*Zea mays* L.)

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta da família *Poaceae*, originária da América Central, com grande capacidade de adaptação a diversos climas, permitindo que seu cultivo seja realizado em todas as partes do mundo (MATOS et al., 2006). Sua importância econômica está relacionada com a multiplicidade que este cereal apresenta no consumo “in natura” ou na forma de produtos industrializados. Tem grande contribuição na alimentação humana e animal, em função principalmente, de suas características nutricionais como excelente fonte energética, apresentando alto teor de amido, lipídios, proteínas e vitaminas.

No cenário de produção mundial do grão, o Brasil é o terceiro no ranking, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China, sendo responsável por 8% das 988 milhões de toneladas produzidas, segundo levantamentos do *United States Department of Agriculture* USDA (2014). Na safra brasileira 2014/2015 a produção foi de 80.208,4 milhões de toneladas em uma área de 15.481,8 milhões de hectares (CONAB, 2015).

O milho se tornou uma alternativa de grande valor econômico para os pequenos e médios agricultores em virtude do preço de mercado e da demanda pelo produto *in natura*. É utilizado na alimentação animal e na alimentação humana com importante valor cultural, principalmente no Nordeste, em épocas festivas. O milho pode ser consumido cozido, assado ou na forma de curau, de suco e também como ingrediente na fabricação de bolos, biscoitos, sorvetes, pamonhas e de outros alimentos.

Pertencente ao grupo de plantas C4, o milho não apresenta saturação à radiação solar, o que lhe permite alcançar elevados índices de produtividade (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000), que ocorrem quando a máxima área foliar coincide com a maior captação de energia radiante, desde que não haja estresse hídrico (BERGAMASHI, 2004).

Baixos níveis de produtividade têm sido obtidos em diversos locais e uma das principais causas é a baixa disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente N (OLIVEIRA et al., 2009), o genótipo utilizado, clima, práticas culturais, pragas e doenças (FANCELLI e DOURADO NETO, 2004; FORNASIERI-FILHO, 2007) Isso torna importante e necessário o desenvolvimento de estudos que visem solucionar os

problemas que envolvem esses fatores, buscando obter altas produtividades, com elevada qualidade e baixo impacto ambiental.

Essas plantas podem se beneficiar bastante da associação com a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e/ou com bactérias promotoras de crescimento, neste último caso, contribuindo para um aumento da superfície da raiz e de crescimento, melhorando a absorção de nutrientes e água, e aumentando eficiência da adubação nitrogenada.

A importância do milho não está relacionada apenas na produção anual, mas em todo o envolvimento que essa cultura tem na produção agropecuária brasileira, tanto no que diz respeito a fatores econômicos, quanto aos fatores sociais. Devido a sua versatilidade de uso, pelo aspecto social, o milho é um dos mais importantes produtos do setor agrícola no Brasil.

3.3 Fixação Biológica do Nitrogênio em Gramíneas

O nitrogênio (N) é considerado um dos nutrientes mais importantes para o crescimento e desenvolvimento de plantas. A exigência de N é consequência da sua função estrutural, pois ela faz parte da molécula de compostos orgânicos, como os aminoácidos e proteínas, sendo ainda ativador de muitas enzimas, proporcionando uma vegetação verde e abundante, aumento na folhagem e nos teores de proteínas das plantas (MALAVOLTA, 2006). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por bactérias diazotróficas que possuem o complexo enzimático da nitrogenase, capaz de catalisar a fixação do nitrogênio atmosférico (DÖBEREINER et al., 1993, DIDONET, 2007), possível apenas a um seleto grupo de micro-organismos, as bactérias diazotróficas, de vida livre (anaeróbias, aeróbias e facultativas ou endofíticas). Estas bactérias possuem a enzima nitrogenase, cuja presença as torna capazes de reduzir o N₂ para a forma combinada inorgânica de amônia (NH₃), que pode ser assimilado pelas plantas e outros organismos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006)

A nitrogenase mais estudada é composta por duas unidades proteicas. A responsável pela redução do substrato, nitrogenase redutase, codificada pelos genes *nifHDK*, contém ferro e molibdênio e a responsável pela ligação ao ATP e doadora de elétrons, codificada pelo gene *nifH*, contém ferro. Outros sistemas de enzimas podem existir, nos quais, aparentemente, o molibdênio é substituído por vanádio ou ferro (REES E HOWARD, 2000).

Desde o isolamento de *Beijerinckia fluminense* da rizosfera da *Papalum notatum* (DOBEREINER e RUSCHEL, 1958) demonstrando o potencial dos diazotróficos em se associarem com gramíneas e com a reidentificação de *Spirillum lipoferum* como *Azospirillum lipoferum* isolado de raízes de diversas gramíneas (DOBEREINER e DAY, 1976), novas espécies de bactérias diazotróficas tem sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas, cafeeiros, bananeiras, abacaxizeiros, plantas como batata-doce e mandioca.

Na cultura do milho existem diversos estudos de associações com bactérias fixadoras de nitrogênio. Mesmo não formando nódulos, auxiliam na assimilação do nitrogênio atmosférico por processos de colonização da superfície e/ou interior das raízes. Isso ressalta a importância da seleção de estirpes adaptadas às condições de cultivo para possíveis recomendações com fins comerciais (BODDEY e DÖBEREINER, 1995; BALDANI et al., 1997; REINHOLD –HUREK e HUREK, 1998; ROESCH et al., 2005; DIDONET, 2007).

Para a cultura do milho alcançar a produtividade satisfatória, são necessários, aproximadamente 90 kg de N.ha⁻¹ na região semiárida. O alto custo desse insumo, bem como os riscos de poluição ambiental decorrentes de adubação nitrogenada, como emissão de óxido nitroso, potente gás do efeito estufa, incentivam a procura por alternativas que reduzam o uso de fertilizantes nitrogenados. O uso de inoculantes em gramíneas como o milho e outros cereais pode substituir o nitrogênio sintético de forma parcial no cultivo destas culturas. A FBN pode contribuir em aumento de 20 a 30% na assimilação de nitrogênio, em especial, à cultura do milho (MOREIRA et al., 2010), que vão além da fixação biológica de nitrogênio, razão pela qual as bactérias são classificadas como promotoras de crescimento de plantas (BASHAN et al. 2004; HUNGRIA, 2011).

Segundo VESSEY (2003), essa associação é um processo fisiológico importante, visto como uma porta de entrada ecológica e econômica de nitrogênio no sistema solo-planta, sendo considerada uma associação promissora para a agricultura de baixa utilização de insumo, quando comparada com a adubação mineral. A interação planta-micro-organismo que ocorre na rizosfera, produz efeitos positivos nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e podem ter importantes implicações na agricultura (BALOTA et al., 2012).

Estudos avaliando a inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Azotobacter chroococcum* em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), mostraram que houve um aumento na produção de grãos em até 6,2% em relação a plantas que não receberam a inoculação (TILAK et al., 1981). A inoculação de *Azospirillum* também foi testada em plantas de trigo, sendo observado um aumento significativo de raízes devido, possivelmente, a produção de fitormônios, principalmente, auxinas produzidas pelas bactérias. Dessa forma, mesmo não observando um incremento em rendimento de grãos, foi verificado um melhor aproveitamento do fertilizante, principalmente nas fases iniciais da cultura, devido ao maior desenvolvimento radicular (DIDONET et al., 2000).

REIS JUNIOR et al. (2008) avaliando 8 variedades de milho (Sol da Manhã, Eldorado, BR 106, BR 451, BRS 4150, MC 5, MC 4 e MC 10), relataram a presença de mais de 104 bactérias diazotróficas em associação com as diferentes variedades. Os resultados demonstraram que as bactérias do gênero *Herbaspirillum* que foram obtidas no isolamento, foram superiores a do gênero *Azospirillum* spp. (*A. brasilense* e *A. lipoferum*). REIS JUNIOR et al. (2008) testaram também a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico pelos isolados de raízes de milho, estirpes *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum* tiveram sua atividade nitrogenase averiguada pela metodologia de redução do acetileno. Todos os isolados apresentaram capacidade de reduzir acetileno

Devido à alta diversidade de bactérias diazotróficas, as plantas de milho podem ser colonizadas ao mesmo tempo por diversas espécies. Dentre as mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus*. Bactérias do gênero *Azospirillum* são consideradas endofíticas facultativas (BALDANI et al., 1997), pois além de colonizarem os hospedeiros podem sobreviver no solo na forma de cistos (BASHAN e HOLGUIN, 1997). Apesar da especificidade com relação a seus hospedeiros ser baixa (BALDANI et al., 1997), a associação dessas bactérias fixadoras de nitrogênio é mais frequente em gramíneas (BALDANI et al., 1999)

MEHNAZ, et al., (2006), realizaram estudos de identificação de bactérias residentes na rizosfera de milho crescido no Sudeste de Ontário (Canadá), isolando linhagens do solo aderidas às raízes do milho. Algumas apresentaram atividade de fixação de nitrogênio e produziram ácido indol acético. Os isolados foram comparados com três espécies do gênero *Gluconacetobacter* através de testes bioquímicos e moleculares. Esses resultados evidenciam os benefícios que as bactérias promotoras de

crescimento podem proporcionar ao disponibilizar nitrogênio às plantas para serem usadas em seu metabolismo e crescimento (ARRUDA, 2012).

Para o milho há quatro bactérias recomendadas no Brasil que pertencem à espécie *Azospirillum brasilense* e uma estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* teve sua eficiência agrônômica reconhecida e sua recomendação oficial já foi solicitada ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Apesar de ser recomendado para todo o Brasil, os experimentos que subsidiaram a recomendação das estirpes de *A. brasilense* foram realizados fora da região nordeste (HUNGRIA et al., 2010, REIS et al., 2011). Atualmente, as avaliações com estas estirpes estão sendo conduzidos no Nordeste em um estudo coordenado pela Embrapa Semiárido onde já se observou que a produtividade das variedades de milho BRS Gorutuba e BRS Caatingueiro foram significativamente maiores quando inoculadas com as estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em condições de baixa fertilização com N (SAMPAIO, 2013).

Apesar de as estirpes atualmente recomendadas, ou em fase de recomendação, apresentarem a capacidade de incrementar a produção do milho na região Semiárida, a seleção de estirpes autóctones pode colaborar para o alcance de incrementos ainda maiores na produtividade, por apresentarem melhor adaptabilidade e estabilidade nas condições da região como solos com condutividade elétrica elevada, altas temperaturas e baixa precipitação

3.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

As bactérias promotoras de crescimento são definidas como um grupo heterogêneo de bactérias de vida livre que podem se associar a rizosfera de plantas e que contribuem para o crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse econômico, direta e/ou indiretamente (ESTRADA et al., 2013; FAN et al., 2011). Diretamente através da fixação do nitrogênio atmosférico; solubilização de compostos minerais como fósforo; produção de sideróforos (quelantes de ferro); produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, tais como auxina, giberelina, citocinina e etileno; e indiretamente através do antagonismo a organismos fitopatogênicos tais como fungos, vírus e nematoides e indução da resistência sistêmica contra doenças (ARRUDA et al., 2013; LIU et al., 2013; VAN LOON, 2007; VARGAS et al., 2012; VESSEY, 2003), que pode trazer como benefício o aumento da produtividade.

Plantas da família *Poaceae* (Gramíneas) têm sido conhecidas por apresentar grande potencial para estabelecer interação com algumas bactérias que promovem o crescimento das plantas. Essas bactérias pertencem a diversos gêneros, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (MONTEIRO, et al., 2012; VARGAS et al., 2012).

3.4.1 Produção de Compostos Indólicos (Ácido Indol -3-acético-AIA)

O ácido indol acético é um regulador de crescimento vegetal da classe das auxinas, produzido no meristema apical das plantas, tendo a função de promover o crescimento de raízes e caules através do alongamento celular (CENTELLAS et al. 1999). A auxina é um dos fitormônios que apresenta produção mediada pelas bactérias mais relatadas na literatura. Isso porque é um hormônio de grande importância para o desenvolvimento das plantas, influenciando o crescimento radicular, alongação celular, diferenciação dos tecidos, promovendo o crescimento da planta, atuando na resposta das plantas a luz e a gravidade (BABALOLA, 2010; BALDANI e BALDANI, 2005; REINHOLD-HUREK e HUREK, 2011; VESSEY, 2003). As auxinas são o grupo de fitormônios mais importantes produzidos pelas bactérias *Azospirillum*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (BABALOLA, 2010; BASTIAN et al., 1998; COUILLEROT et al., 2013; VESSEY, 2003). A produção e a concentração de triptofano nos exsudatos das raízes variam com as espécies de plantas (PATTEN; GLICK, 1996).

Em estudo com *Bacillus* ARAÚJO e GUERREIRO (2010), descobriram que a maioria das cepas de milho identificadas como promotoras de crescimento não correspondiam às que produziram níveis mais elevados de AIA em laboratório. A espécie *Pseudomonas fluorescens*, cuja produção de AIA foi de apenas 15,63 ng / mL, aumentou comprimento radicular em plantas de milho, de acordo com HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al. (2008).

3.4.2 Solubilização de Fosfato

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, et.al, 2001) Os

solos tropicais da região Semiárida, geralmente apresentam altos teores de Fe e Al, o que causa redução na disponibilidade de P inorgânico no solo (NOVAIS e SMYTH, 1999).

Exercendo um papel importante no ciclo natural do P, os micro-organismos são responsáveis pela liberação de ácidos orgânicos, que atuam como doadores de prótons e agentes quelantes aos íons Al e Fe, favorecendo a solubilização do fosfato inorgânico no solo (RODRÍGUEZ E FRAGA, 1999). Micro-organismos 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 et al., 2005; KHAN et al., 2007). 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). Em pesquisas realizadas com arroz, de 336 cepas associadas a gramínea, SOUZA et al. (2013) identificaram 101 isolados pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Cedecea*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas* que foram capazes de solubilizar fosfato tricálcio [Ca₃(PO₄)₂].

FANKEM et al. (2008), ao avaliar em solo ácido com baixo nível de fósforo o desempenho de plantas de milho, verificaram maiores médias de altura de plantas na presença de duas das três estirpes de *P. fluorescens* avaliadas. No entanto, ZUCARELI et al. (2011) não detectaram alteração na altura de plantas, em estudo relativo à eficiência agrônômica do inoculante à base de *Pseudomonas fluorescens* em milho conduzido a campo.

3.4.3 Produção de Sideróforos

Sideróforos são ligantes específicos (quelantes) de Fe³⁺ produzidos, em condições de deficiência deste íon, por fungos e bactérias, com a função de incorporar este mineral no metabolismo celular (SILVA e OLIVEIRA, 2011). 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, et al, 2002). Esses compostos atuam como promotores de crescimento pela capacidade de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, sequestrando a maioria do Fe⁺³ disponível, desta forma facilitando o crescimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2003).

Há muito tempo já se comprovou que isolados do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas* podem promover o crescimento vegetal por privar de ferro potenciais fitopatógenos (KLOEPPER et al., 1980). De acordo com BENITE e MACHADO (2002) aspectos estruturais e funções biológicas dos sideróforos estão sendo amplamente estudadas em *Pseudomonas* spp.. Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas como produtoras de sideróforos e podem ter papel importante como biofertilizantes para aumento da concentração de micronutrientes em grãos em culturas como o milho.

COSTA et al. (2014) ao analisar em conjunto, dados de sete estudos independentes que empregaram metodologias semelhantes para bioprospecção, observaram que 64% de todos os isolados e 100% de todos os gêneros de bactérias apresentaram cepas produtoras de sideróforos.

3.5 Antagonismo a patógenos

O interesse pela utilização de microrganismos endofíticos como ferramentas de biocontrole de fitopatógenos nos diferentes agroecossistemas tem aumentado em importância por apresentarem atividades antagonistas contra diferentes organismos fitopatogênicos e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole de doenças e pragas de plantas (BENHAMOU et al., 2000; STURZ; NOWAK, 2000; SESSITSCH et al., 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). Em culturas como tomate (SILVA et al., 2008), soja, feijão e algodão (ASSUMPCÃO et al., 2009) já são descritas ações de bactérias que reduzem o crescimento de microrganismos em plantas, mostrando que o antagonismo pode beneficiar o desenvolvimento vegetal. BEVIVINO et al. (1998) também observaram resultados de antagonismo de linhagens de *Burkholderia cepacia* contra *Fusarium* spp., que dependendo da espécie, podem atacar a cultura do milho causando podridão do colmo, da ponta da espiga e produzir toxinas.

É importante salientar que o mecanismo de inibição pode estar associado à produção de metabólitos como enzimas líticas que destroem componentes celulares de fungos fitopatogênicos. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas veronii* e *Sphingomonas trueperi* isoladas de arroz inibiram o crescimento in vitro de *Achlya klebsiana* e *Pythium spinosum*, que são os principais patógenos em plântulas do arroz. Essas bactérias também promoveram o crescimento de plantas (ZINNIEL et al., 2002). Outra espécie, *Bacillus cereus*, isolada de Sinapis excreta quitinase e sua

aplicação no solo protegeu de forma significativa plântulas de algodão contra doenças causadas por *Rhizoctonia solani* (PLEBAN et al., 1997).

O manejo de bactérias associativas para leguminosas está bem sucedido e aplicado em todo país, principalmente na cultura da soja na substituição do Nitrogênio. Já em gramíneas, esse ainda não está bem esclarecido. A interação dos microrganismos associativos com as plantas não tem a mesma fisiologia das simbioses entre rizóbios e leguminosas, o que pode acarretar em menor eficiência dos processos que realizam.

3.6 A importância de técnicas moleculares nos estudos de diversidade

A avaliação da diversidade de bactérias diazotróficas presentes nos tecidos, nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta, pode ajudar a compreender o papel desses micro-organismos em seu habitat. A comunidade microbiana que ali se encontra apresenta uma enorme diversidade em estado de equilíbrio dinâmico, o que reflete diretamente no ambiente físico, químico, biológico e suas relações (EHRENFELD et al. 2005). Na agricultura existe um interesse em micro-organismos que desempenham funções específicas no solo ou que fazem associações com plantas, como é o caso das diazotróficas (RÖESCH 2007). Dentre as bactérias que fixam N e são capazes de se associarem a gramíneas, as do gênero *Azospirillum* são as mais estudadas, principalmente as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* que juntamente à *A. amazonense* têm sido encontradas em associações com plantas de milho, arroz, sorgo e gramíneas forrageiras (REIS et al. 2006).

Na literatura, já existe estudos de associações de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Klebsiella* mais frequentes em estudos da interação de diazotróficos com o milho . O gênero *Burkholderia* também tem sido encontrado associado a plantas de milho cultivadas no Brasil e no México (PERIN et al., 2006). A ocorrência destes organismos em associação com o milho em diferentes regiões geográficas, com diferentes tipos de solo e clima da região pode indicar que certos gêneros de bactérias diazotróficas estão associados preferencialmente ao milho, independentemente das condições oferecidas à planta. Já existe estudos com o gênero *Rhizobium* infectando o interior dos tecidos de plantas, principalmente no sistema de rotação de culturas com plantas leguminosas, porém ainda é escasso as pesquisas e efeitos que essas bactérias causam quando associadas ao milho.

Em trabalho conduzido por SCHLOTTER et al. (1997), células de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii colonizaram plântulas de milho e trigo. A espécie

diazotrófica *Rhizobium tropici* isolado CIAT899 foi reconhecida por ROSENBLUETH et. al, 2004) como uma espécie endofítica competitiva capaz de se associar a plantas de milho em experimentos de inoculação o que demonstra que estes organismos estão naturalmente associados ao milho.

Estudos de colonização de bactérias diazotróficas enfocam processos de reconhecimento planta-bactéria e requerem o conhecimento do ambiente de estudo. Identificar micro-organismos através da caracterização genética permite desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a caracterização de populações microbianas, associado ao aprofundamento dos estudos taxonômicos, fisiológicos, ecológicos e econômicos desses seres vivos, propiciando a compreensão de sua diversidade e interação com o solo, elucidando aspectos práticos relacionados ao manejo do solo (FERREIRA et al.,2000).

Com os avanços na área de biologia molecular, com as técnicas de extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA, tem sido possível a identificação de novos micro-organismos, principalmente de bactérias por apresentar alta população.

A reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) é uma técnica molecular que a partir da extração do DNA, possibilita amplificação de sequências de interesse utilizando tanto “primers” específicos como ao acaso e “primers” de regiões conservadas do DNA. Essa técnica foi desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis e a partir dela, mudou-se a forma de análise do DNA em função da produção de múltiplas cópias de sequências específicas, sem a necessidade da técnica de clonagem (ALBERTS et al., 2004). Métodos de extração de DNA que envolvem procedimentos relacionados à quebra ou digestão de paredes e membranas celulares foram aprimorados, viabilizando a liberação do conteúdo genético celular e do material genético o que tem permitido o estudo e caracterização genética destes micro-organismos (PEDRINHO, 2009).

Embora métodos fenotípicos clássicos sejam comumente utilizados para identificar micro-organismos, são insuficientes para discriminar as espécies e estirpes, mas quando associada com técnicas moleculares, resultam na identificação microbiana confiável. As técnicas moleculares, PCR e sequenciamento de regiões conservadas do DNA bacteriano, com destaque para as de 16S rRNA tem se mostrado eficiente para a identificação da diversidade bacteriana. Por meio dela é possível definir a posição dos procaríotos em nível de gênero e fornece uma considerável base de dados para

comparação de sequências do rRNA no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (VIDEIRA, 2008).

Outra técnica utilizada em estudos de diversidade é a ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado), metodologia que consiste em análises combinadas de sequências de DNA ribossomal amplificadas por PCR a partir da utilização de enzimas de restrição que gera como produto, padrões de polimorfismo, sendo uma técnica bastante utilizada nos estudos de diversidade de rizóbio (LAGUERRE et al., 1994). A aplicação destas metodologias no estudo da diversidade de bactérias tem permitido a descoberta de um número extenso de novas linhas evolutivas nesse grupo.

Caracterização de bactérias associadas com a cultura do milho pode fornecer informações valiosas para o nosso ainda escasso conhecimento sobre a interação planta-bactéria com diferentes genótipos, além da possibilidade de reconhecer as estratégias que podem beneficiar a produção do milho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área experimental e coleta das amostras

As plantas de milho foram cultivadas em duas áreas experimentais da Embrapa Semiárido: Campo Experimental de Mandacaru (09°24'S, 40°26'W), situado em Juazeiro, BA e no Campo Experimental de Bebedouro (09°09'S, 40°22'W) em Petrolina, PE. Estes locais foram escolhidos porque seus solos apresentam características químicas e físicas distintas, sendo um Vertissolo Háptico no campo de Mandacaru e Argissolo Vermelho-Amarelo no campo de Bebedouro.

Amostras compostas de solo na profundidade 0-20 cm foram coletadas em cada área para análise química de acordo com Embrapa (1997). Para o Vertissolo do Campo Experimental de Mandacaru a análise revelou os seguintes parâmetros: pH 7,1, Matéria orgânica 8,1 (g/kg); P 3,31 (mg/dm³); K 0,5 (cmolc/dm³). Para o Argissolo do Campo Experimental de Bebedouro, foi demonstrado os seguintes resultados: pH 6,7, Matéria orgânica 5,9 (g/kg); P 34,40 (mg/dm³); K 0,5 (cmolc/dm³)

Para avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas associadas ao milho, duas cultivares de milho, BRS Caatingueiro e BRS Gorutuba, foram semeadas em faixas de aproximadamente 4 metros de largura por 15 metros de comprimento. Os tratamentos consistiram na aplicação, ou não, de N (90 kg de N.ha⁻¹) dividido em duas aplicações, sendo uma no plantio e uma quinze dias após o plantio.

Entre 40-45 dias após semeadura, foram realizadas coletas de três amostras de cada cultivar (BRS Caatingueiro e BRS Gorutuba), localidade (Mandacaru e Bebedouro) e tratamento (com ou sem N). Cada amostra consistiu em um conjunto de 3-4 plantas. As plantas foram removidas com auxílio de uma pá e, em campo, separadas a raiz e o colmo.

Após a coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido e armazenadas em câmara fria a 10° C até posterior processamento dentro de, no máximo, uma semana.

4.1.2 Isolamento das Bactérias

O excesso de solo da raiz foi removido e o solo aderido à raiz foi cuidadosamente retirado e 10 g foram acondicionados em frascos de solução contendo 90 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v). Esse conteúdo foi agitado manualmente de forma vigorosa para a obtenção da Suspensão 1, com o objetivo de obter os micro-

organismos presentes no solo rizosférico. Após este processo a raiz foi desinfestada superficialmente com NaClO (2% v/v) e o excesso do agente sanitizante foi removido por lavagem e água de torneira abundantemente. Posteriormente, a raiz foi lavada 8 vezes em água destilada estéril (ADE) e triturada juntamente com 90 mL de solução salina para a obtenção da Suspensão 2, com o objetivo de isolar os micro-organismos endofíticos da raiz.

Para as amostras de colmo, utilizou-se a região da base da parte aérea, logo acima da região do solo. Para cada planta, 10 g do colmo foi desinfestado superficialmente com a remoção do agente sanitizante da mesma forma que foi descrita para a raiz. Também, como descrito para a raiz, o colmo foi triturado em solução salina para a obtenção da suspensão 3, com o objetivo de isolar os micro-organismos endofíticos do colmo. Para amostras de raiz e colmo, alíquotas de 100 µL da última ADE das lavagens para a remoção do agente sanitizante foram inoculadas em placas de Petri com meio Dyg`s para verificar a presença de micro-organismos não endofíticos remanescentes.

As três suspensões obtidas (Suspensões 1, 2 e 3) foram diluídas seriadamente até a diluição 10^{-6} . As diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-6} para cada uma das suspensões foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Dyg`s sólido (metodologia 1), meio BMGM semissólido sólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) (metodologia 2) e em sementes de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris*), sabiá (*Mimosa caesalinifolia*) e feijão-caipi (*Vigna unguiculata*) (metodologia 3) conforme descrito abaixo e esquematizado na figura 1.

4.1.3 Metodologia 1: Isolamento das bactérias em meio sólido

Foi adotada a estratégia de isolamento utilizada recentemente por FERNANDES JÚNIOR ET al. (2013a) onde apenas as diluições de 10^{-3} e 10^{-6} das suspensões 2 e 3 foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Dyg's sólido com adição de ciclohexamida como fungicida. As placas foram incubadas em estufa à temperatura de 28°C por 7 dias. Após a incubação, cada colônia com aspecto distinto, foi considerada um isolado e foi purificada. Foram purificados isolados da diluição menos concentrada onde foi possível distinguir as colônias. As bactérias foram então inoculadas em meio semissólido BMGM para avaliar a formação da película dos isolados.

Neste trabalho, os isolados obtidos por meio desta metodologia tiveram o seu código iniciado pela letra “P” de “placa”.

4.1.4 Metodologia 2: Isolamento dos microrganismos diazotróficos em meio semissólido

Utilizando a abordagem clássica para a obtenção de bactérias fixadoras de N em condições microaerofílicas associadas a não leguminosas através da inoculação das diluições seriadas (de raízes, colmo e solo) em meio semissólido livre de N (DÖBEREINER et al., 1995). As diluições seriadas foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de meio BMGM semissólido (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) em triplicata. Para o isolamento das bactérias, foi considerada a diluição menos concentradas onde houve a formação de película no meio semissólido. As bactérias foram transferidas mais uma vez para o meio semissólido BMGM e incubadas a 28° C, após a formação da película, as bactérias foram inoculadas sucessivas vezes em placas de Petri contendo meio Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986) sólido até a obtenção de culturas puras;

Neste trabalho, os isolados obtidos por meio desta metodologia tiveram o seu código iniciado pela letra “D” em alusão ao nome da Dra. Johanna Döbereiner, quem desenvolveu esta metodologia para o isolamento de diazotróficos associativos.

4.1.5 Metodologia 3: Obtenção dos isolados utilizando leguminosas como plantas isca

Devido ao grande número de trabalhos publicados relacionando a presença de rizóbios promovendo o crescimento em associação com gramíneas (CHI et al., 2005; SINGH et al., 2006; PENG et al., 2008; SOUZA et al., 2013; ROUWS et al., 2014), a

terceira abordagem foi adotada com o objetivo de acessar estas bactérias que por apresentarem, em muitos dos casos, crescimento lento não são facilmente acessadas quando utiliza-se os métodos mais usuais de isolamento. Desta forma, as diluições seriadas 10^{-3} e 10^{-6} foram inoculadas em sementes do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) BRS Pujante; do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) BRS Ouro Negro e do sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*). Estas três espécies foram selecionadas com o objetivo de se obter bactérias nodulantes do grupo dos *Bradyrhizobium*, nodulantes preferenciais do feijão-caupi, *Rhizobium* e *Ensifer*, simbiontes comumente isolados do feijoeiro comum e dos β -rizóbios, simbiontes preferenciais do gênero *Mimosa*.

As sementes foram previamente desinfestadas superficialmente e semeadas em vasos com areia autoclavada. A inoculação ocorreu no momento da semeadura. As plantas foram cultivadas até o estágio florescimento para o feijão-caupi e feijoeiro-comum e até os 90 dias após o plantio para o sabiá. Na coleta, a nodulação foi verificada e para as plantas nodulantes, os rizóbios foram isolados. Para o isolamento os nódulos foram desinfestados superficialmente segundo VINCENT (1970) e espremidos com o auxílio de uma pinça em placas de Petri contendo meio YMA e inoculadas sucessivas vezes no mesmo meio para a purificação dos isolados. Após o isolamento e purificação, os rizóbios foram avaliados quanto à capacidade de fixar o nitrogênio em condições microaerofílicas em meio semissólido (DÖBEREINER et al., 1995).

Neste trabalho, os isolados obtidos por meio desta metodologia tiveram o seu código iniciado pela letra “L” de “leguminosa”.

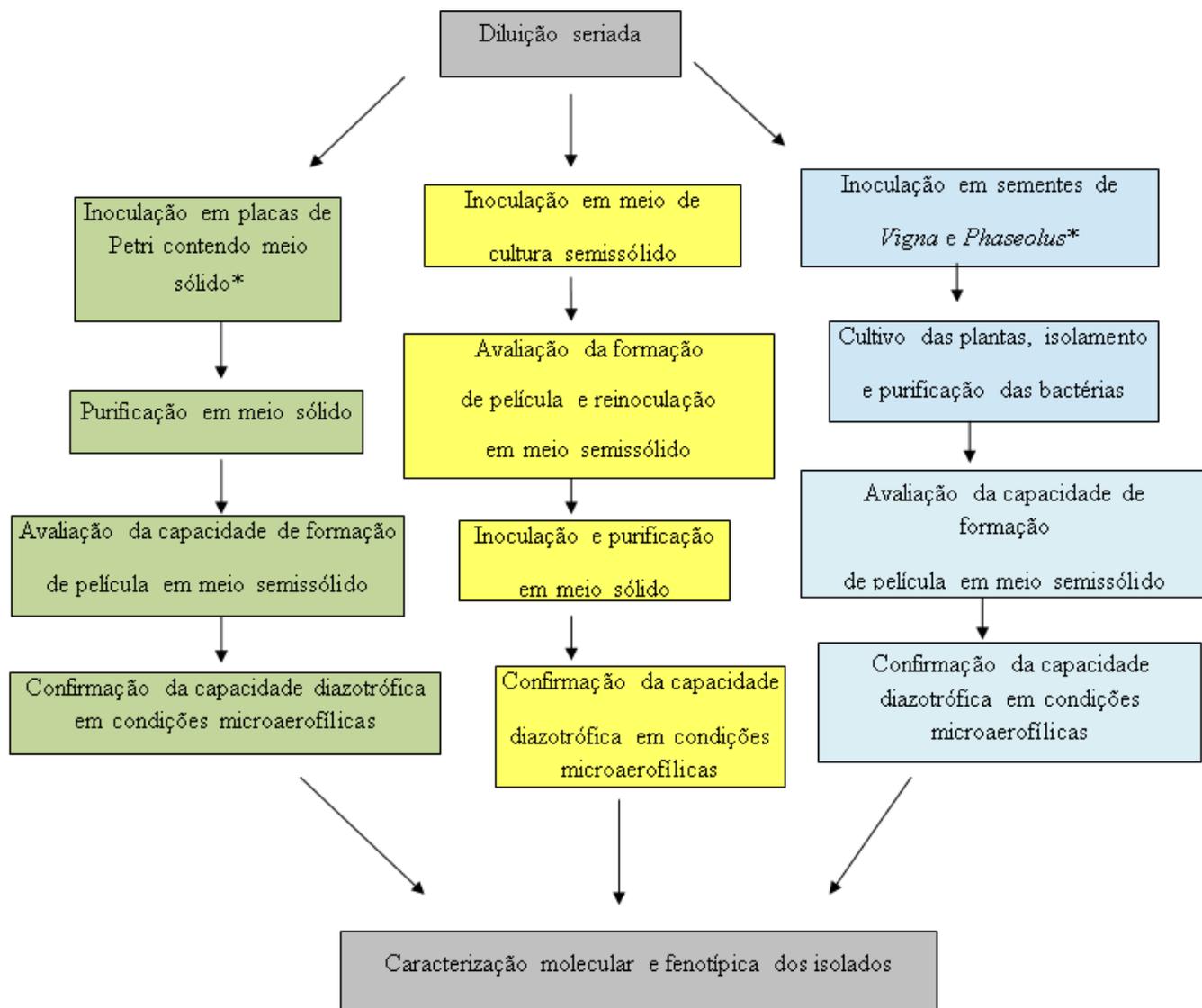


Figura 1. Esquematização das abordagens metodológicas utilizadas para a obtenção dos isolados de bactérias diazotróficas do milho.*= metodologias utilizadas. Fonte: Paulo Ivan Fernandes Júnior

4.2 Caracterização fenotípica das colônias

A caracterização morfológica das colônias foi realizada após a purificação dos isolados em meio Dyg`s. Para as colônias obtidas de placas e meio semissólido, foram avaliados os seguintes parâmetros: o tamanho das colônias em (<1; 1-2; >2)mm de diâmetro, a forma (circular ou irregular), a cor (creme, amarela, laranja, marrom, outra), a transparência (translúcida ou opaca), a elevação, a presença e a quantidade de muco (pouco ou muito).

Para os rízóbios, a caracterização fenotípica dos isolados puros foi feita em meio YMA avaliando-se a alteração do pH (ácido, neutro ou alcalino), o tempo de crescimento das colônias (rápida: até 3 dias; intermediária: 4 a 5 dias e lenta: acima de 6 dias), cor da colônia (branca, amarela, outra), tipo de muco (viscoso ou floculoso) e quantidade de muco (pouco ou muito).

4.3 Caracterizações moleculares dos isolados

4.3.1 Extração de DNA

Além da caracterização cultural, foi também realizada a caracterização molecular das bactérias. Para a extração do DNA, as bactérias foram cultivadas em meio líquido, adequado a cada metodologia. Uma alíquota de 500 µL do caldo de cultivo foi adicionado em tubos de 1,5 mL novos e centrifugado (12000 rpm por 3 min). O sobrenadante foi descartado, em seguida foi adicionada água destilada autoclavada (500 µL) ao precipitado e realizada uma nova centrifugação. Esse processo foi repetido por duas vezes. Com objetivo de promover a lise celular, após a lavagem, o precipitado foi submetido a choque térmico em água fervente e a congelamento a -20°C (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013b). Por fim, o material foi armazenado a -20°C até uso.

4.3.2 Amplificação da presença do gene *nifH*

Os isolados bacterianos que apresentaram capacidade de formação de película em meio semissólido, para a metodologia 2 e todas as bactérias da metodologia 1, foram avaliados quanto a presença do gene *nifH*, que codifica a enzima dinitrogenase redutase do complexo enzimático nitrogenase, por meio de PCR.

A PCR para o *nifH* utilizou o par de iniciadores PoIF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PoIR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) (POLY

et al., 2001) para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 360 pb. Esse par foi de iniciadores foi escolhido por amplificar uma região do gene *nifH* conservada na maioria dos procariontes fixadores de N. A reação de PCR foi realizada mediante preparo do mix de soluções para um volume final de 10 µL, contendo tampão de reação 1X; 2,5 mM MgCl₂; 1,2 dNTP mM; 1,0 U Taq DNA polimerase e 1,0 µM de cada iniciador PolF e PolR e 2,0 µL de DNA molde. O ciclo de amplificação consistiu de um ciclo desnaturação inicial (5 minutos a 94° C) seguido de 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), anelamento (45 segundos a 55° C); extensão (1 minuto a 72° C); um ciclo de extensão final (10 minutos a 72° C) e manutenção das amostras a 4° C no termociclador.

Alguns isolados não apresentaram resultados positivos para a amplificação do gene *nifH*, por isso, foi realizada a técnica de nested PCR. Nesta metodologia uma PCR inicial foi realizada com iniciador para o gene *nifH* e o produto desta reação usado como molde para a segunda reação. A segunda reação é realizada com um iniciador cujo amplicon específico apresenta um tamanho menor.

A primeira reação do nested PCR foi conduzida para o gene *nifH* como descrito acima. Já a segunda reação amplificou diversos fragmentos do gene *nifH* e utilizou-se o seguinte par de oligonucleotídeos iniciadores (SOARES et al., 2006): *nifH*For (ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAGG) e *nifH*Rev (ACGATGTAGATTTTCCTGGGCCTTGTT). A reação de nested PCR foi feita em 10 µL do mix de soluções contendo tampão de reação 1X, 2,5 mM MgCl₂; 1,2 dNTP mM; 1,0 U Taq DNA polimerase e 1,0µM de cada iniciador *nifH*For e *nifH*Rev além de 0,35 µL do produto da primeira PCR como molde. O ciclo de amplificação constou de: um ciclo desnaturação inicial (5 minutos a 94° C) seguido por 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94° C), anelamento (45 segundos a 55° C); extensão (1 minuto a 72° C); um ciclo de extensão final (10 minutos a 72° C), seguido pela manutenção das amostras 4° C no termociclador.

Os isolados que apresentaram amplificação positiva para o gene *nifH* foram selecionados para os testes posteriores de análises bioquímicas dos mecanismos complementares de promoção do crescimento, como a produção de ácido indol-acético (AIA) com e sem triptofano, solubilização de fosfatos, antagonismo e produção de sideróforos.

Para as reações de PCR duas estirpes foram utilizadas como controle positivo. A estirpe Ab-V5(*Azospirillum brasilense*) e BR 11417 (*Herbaspirillum seropedicae*). Os

produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 100 V por 120 minutos. O gel foi corado com GelRed (Biotium) 0,5X aplicado diretamente no tampão de carregamento das amostras e a visualização do gel realizada em um transluminador sob luz UV.

4.3.3 – Duplex PCR para a amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC* das bactérias isoladas de nódulos

O DNA das amostras provenientes de isolados de nódulos de feijão-caupi (metodologia 3) foi extraído utilizando um kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até as manipulações. Nas PCRs foram utilizados os iniciadores PolF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PolR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 360 pb correspondente à parte do gene *nifH* no operon *nifHDK* (POL et al., 2001) e NodCF (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e NodCR(I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) para a amplificação de um fragmento interno ao gene *nodC* com aproximadamente 980 pb (LAGUERRE et al., 2001).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (p/v) a 100 V por 120 minutos. As amostras receberam o corante GelRed (Boitium) 0,5X diretamente no tampão de carregamento das amostras. A visualização do gel foi realizada em um transluminador sob luz UV.

4.3.4 – Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Os isolados que apresentação amplificação positiva para o gene *nifH* e Duplex-PCR (metodologias 1 e 3, respectivamente), e através do teste de produção de AIA para a metodologia 2, devido a baixa incidência de amplificação, tiveram a sua variabilidade genética avaliada por meio da técnica de Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).

Primeiramente foi amplificado o gene para a subunidade ribossomal 16S. Os iniciadores utilizados para as reações de amplificação foram o 27F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg et al., 1991). A reação final de PCR para o gene de 16S foi redimensionada para 35µl contendo tampão de reação 1X; 2,0 mM MgCl₂; 1,0 mM dNTP, 1,0 U Taq DNA polimerase, água, 0,75 µM de cada iniciador e 5 µM do DNA molde. A amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 35

ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final 72°C por 5 min.

Após verificada a amplificação por eletroforese horizontal em gel de agarose (gel 1%, 150 V por 30 min) seguiu-se à metodologia de restrição com do ARDRA. Para análise de restrição foram utilizadas as endonucleases *Hinf*I, *Hha*I e *Msp*I. O meio de reação para a restrição enzimática era constituído de 10 uL do produto da PCR do gene 16S rRNA, o tampão de reação da enzima (2uL) e a enzima de restrição (2uL). A reação de digestão foi incubada a 37° C “overnight”. O DNA digerido foi analisado em eletroforese horizontal em gel de agarose 3% em tampão TAE 1X por duas horas, em uma voltagem constante de 110V.

4.4 Mecanismos de Promoção do Crescimento Vegetal

4.4.1 – Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

As bactérias selecionadas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir compostos indólicos “in vitro”. Cada bactéria foi inoculada, a partir de uma colônia em 5 mL de meio líquido Dyg`s. Para os isolados obtidos de planta isca (feijão-caupi) foi utilizado o meio YM sem azul de bromotimol. As bactérias foram incubadas sob agitação constante para a produção de um pré-inóculo. Assim, alíquotas de 1 mL do pré-inóculo foram inoculadas em meio líquido adequado, suplementado com e sem triptofano, em triplicata, e incubadas sob agitação constante durante 7 dias.

Após esse período avaliou-se a densidade ótica (DO) das culturas (540 nm) em espectrofotometro, ajustando-se a sua concentração para $DO_{540} = 0,5$. Após o ajuste da DO_{540} , alíquotas de 1ml foram centrifugadas durante 3 min a 6000 rpm. Um alíquota de 100 µl de reagente de Salkowski (2% de $FeCl_3$ 0,5 M em 35% de ácido perclórico) foram adicionados a 150 µl do sobrenadante e incubados no escuro durante 30 minutos e, em seguida, leituras a 530 nm foram procedidas em espectrofotômetro em microplacas de ELISA.

Para a estimativa da produção de AIA, foi utilizada uma curva padrão, previamente obtida, com concentrações conhecidas de AIA sintético: 0, 50, 100, 150, 200 e 250 µg.L⁻¹. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa SISVAR.

Todas as avaliações foram feitas com três repetições. Como estirpes de referência foram utilizadas as estirpes Ab-V5 de *A. brasilense* e BR 11417 de *H. seropdicae* para as avaliações com as bactérias obtidas por meio das metodologias 1 e 2; e as estirpes BR 3262 de *Bradyrhizobium* sp. e BR 3299 de *Microvirga vignae* para as bactérias obtidas da metodologia 3.

Os experimentos foram realizados com três repetições e os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas com o teste Skott-Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar.

4.4.2 – Solubilização de Tri-fosfato de Cálcio

A avaliação da capacidade das bactérias em solubilizar fosfato inorgânico *in vitro* foi realizada segundo metodologia descrita por Sylvester-Bradley et al. (1982). As culturas foram crescidas em meio líquido e alíquotas de 10µl foram inoculadas em meio sólido contendo glicose (10 g L⁻¹), extrato de levedura (0,5 g L⁻¹) e ágar (15 g L⁻¹). Antes da distribuição em placas, cloreto de cálcio (10%, 100 mL L⁻¹) e fosfato de sódio bibásico (10%, 50 mL L⁻¹) foram adicionados ao meio. As placas foram incubadas em estufa por 15 dias e a capacidade de solubilização do fosfato foi avaliada através da formação do halo translúcido ao redor das colônias com avaliações realizadas a cada 5 dias. O tamanho da colônia e do halo foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada. Foi calculado o índice de solubilização pela razão do diâmetro do halo de solubilização pelo diâmetro da colônia bacteriana.

Os experimentos foram realizados com três repetições e os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas com o teste Skott-Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar.

4.4.3 – Produção de Sideróforos

Assim como as avaliações para a produção de AIA e solubilização de fosfato de cálcio, a avaliação da produção de sideróforos foi feita para todos os isolados. Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura Dyg`s e YM líquido para os rizóbios e crescidos à 28° C, sob agitação constante. Após esse período, adicionou-se 1 mL das culturas em microtubos de 1,5 mL de capacidade. Os microtubos foram então centrifugados durante 10 minutos à 6000 rpm. Adicionou-se 100 µL do sobrenadante de cada cultura a poços de microplacas de ELISA com 100 µL do reagente cromo azurol S (CAS). Após 30 minutos, as amostras foram avaliadas

quanto a produção de sideróforos, qualitativamente usando o meio CAS para quantificar as amostras quanto a mudança de cor alaranjada ou amarelada das amostras indicando a produção de sideróforos pelos isolados, e posteriormente realizando a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm. A produção de sideróforos foi feita quantificada por meio de uma curva com diferentes concentrações de EDTA.

4.4.4 – Quantificação de Proteínas em Meio Semissólido.

As bactérias obtidas por meio da metodologia 2 foram crescidas em meio Dyg's líquido por 48 h. Em seguida, 20 µl do caldo crescido foi inoculado em tubos contendo 5 ml de meio de cultura semissólido (BMGM), por aproximadamente 10 dias. Após o período de incubação os frascos foram submetidos ao agitador de mesa para tubos de ensaio, até a completa homogeneização da película no meio de cultura. Uma alíquota de 100 µl da amostra homogeneizada foi colocada em tubos de ensaio contendo 400 µl de água destilada estéril, para diluir a amostra, e 500 µl de NaOH 1 mol L⁻¹ para lisar as células. Os tubos foram agitados e aquecidos por 5 minutos a 100° C, para extração das proteínas totais e desnaturação do ágar.

Posteriormente adicionou-se 2,5 mL do reagente de Lowry nos tubos que foram agitados e incubados por 10 minutos no escuro. Em seguida, adicionou-se 500 µl do reagente de Folin-Ciocalteu 1 mol L⁻¹, diluído na proporção de 1 porção de reagente para 2 porções de água, e incubados no escuro por 30 minutos. Após incubação, as amostras foram distribuídas em microplacas de ELISA e lidas a absorvância a 750 nm em espectrofotômetro.

A concentração de proteína foi determinada usando a curva padrão obtida pelos valores de absorvância das quantidades conhecidas de BSA (soro-albumina bovina), nas seguintes concentrações de 0,0075; 0,015; 0,0225; 0,03; 0,045; 0,06; 0,07; 0,09; 0,12; 0,15 mol L⁻¹. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

4.4.5 Ensaios de Antagonismo a *Fusarium oxysporum* f.s.p

O antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, fungo causador da podridão do colmo do milho, foi testado pelo método da cultura pareada, que consiste no desafio ou confronto direto do antagonista e do fungo patogênico em placas de Petri contendo meio de cultura sólido. O isolado de *Fusarium* foi cedido pela equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semiárido. As bactérias foram crescidas em placas de Petri

com meio BDA, pH 6,8; a 28°C, por 5 dias. As culturas foram previamente crescidas e riscadas com um traço vertical em uma extremidade da placa.

Para a inoculação do fungo, foram retirados discos das bordas do patógeno em crescimento em placas de Petri com BDA. Em cada placa contendo a bactéria foi riscada numa extremidade da placa e após 24 horas foi colocado apenas um disco no polo oposto a bactéria. Os testes foram realizados com 3 repetições e após 8 dias de incubação foi avaliado se houve competição, antibiose ou se não ocorreu interação entre os micro-organismos avaliados, de acordo com Dias et al. (2014).

4.5 Experimentos em vasos

4.5.1 – Eficiência Simbiótica de Rizóbios de Feijão-Caupi (metodologia 3)

Esse experimento foi realizado em casa de vegetação localizada na Embrapa Semiárido, entre os meses de julho e agosto de 2015. Sementes de feijão-caupi BRS Pujante, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1%, foram semeadas em copos de plástico (500 mL) com areia autoclavada. Em vaso foram semeadas 4 sementes que foram inoculadas com 1 ml de suspensão das culturas dos isolados bacterianos na fase exponencial do crescimento (aproximadamente 10^9 células mL⁻¹). As bactérias utilizadas foram aquelas obtidas da metodologia 3 e selecionadas posteriormente por Duplex PCR. Dentre estas bactérias, 52 isolados foram isolados da área do Campo Experimental Bebedouro e 44 do Campo Experimental de Mandacaru.

O desbaste foi efetuado 10 dias após a emergência das plântulas, deixando apenas 1 planta por vaso. A irrigação foi realizada com ADE conforme necessário e as plantas foram coletadas aos 40 dias após a emergência. O procedimento adotado na coleta consistiu na lavagem das raízes e retirada e contagem dos nódulos. Constituído por 83 tratamentos, sendo 79 correspondentes às inoculações com estirpes isoladas de nódulo de feijão caupi, 2 controles positivos, referentes à inoculação com estirpes inoculantes de feijão, BR3262 e BR3269 e 2 controles negativos sem inoculação, um com N mineral e um controle absoluto. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições. A parte aérea, raízes e nódulos, foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até atingirem massa seca constante para a determinação da massa da parte aérea seca (MPAS), massa das raízes secas (MRS), massa dos nódulos secos (MNS) por pesagem em balança analítica. Após a pesagem, a parte aérea das plantas foi moída e usada para determinação do N-total pelo método de combustão

seca no analisador Elementar de C e N LecoSorb (LECO, EUA), no Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal Solos da Embrapa Semiárido. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições.

4.5.2 – Capacidade de Promoção do Crescimento em Plantas de Milho

Para avaliar a capacidade de promoção de crescimento vegetal e o potencial de fixação de nitrogênio em plantas de milho, as bactérias usadas foram selecionadas seguindo alguns critérios: a) isoladas em placas e em meio semissólido a partir dos testes de promoção de crescimento; b) isoladas pelo método de planta-isca e selecionadas por testes de agrupamento feitos a partir das análises de restrição (ARDRA).

O experimento foi montado no mês de outubro de 2015, na Embrapa Semiárido. Foram semeadas 3 sementes de milho da variedade BRS Gorutuba em vasos com capacidade para 3 L completamente preenchidos com uma amostra de solo do tipo Argissolo Vermelho-Amarelo do Campo Experimental de Bebedouro. Após a emergência, foi realizado o desbaste mantendo-se apenas uma planta por vaso. A inoculação ocorreu na hora do plantio utilizando 1 mL de caldo de cultivo bacteriano por semente. Foram avaliados os parâmetros de crescimento e a ausência de sintomas fitopatogênicos, potencialmente causados pelos micro-organismos. As plantas foram coletadas após 45 dias após a emergência. A parte aérea e a raiz foram colocadas em estufa (65°C por 72 horas) para determinar massa seca da parte aérea seca (MPAS), massa das raízes secas (MRS). O teor de nitrogênio da parte aérea (TNPA) determinado analisador Elementar de C e N LecoSorb (LECO, EUA), no Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal Solos da Embrapa Semiárido. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições.

4.6 Análise dos Dados

Os dados a partir de todas as avaliações quantitativas (solubilização de fosfato, produção de AIA, Sideróforos, Quantificação de Proteínas e os Experimentos de Campo e Vegetação) foram analisados por análise de variância através do teste de comparação de Scott-Knott com significância de 5% através do Software v Sisvar. 5.0.

A similaridade entre os isolados através de suas características fenotípicas, foi avaliada por uma matriz binária, sendo atribuído valores positivos para a presença da característica e valor negativo para ausência da característica. Os dados foram

comparados e a similaridade entre os isolados foi estimada e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa PRIMER, versão 7.0.

Os perfis dos fragmentos de restrição foram utilizados para realizar uma análise de agrupamento utilizando o coeficiente de Jaccard, o algoritmo UPMGA pelo programa BioNumerics 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das coleções e caracterização cultural das bactérias

Um total de 405 bactérias endofíticas foram isoladas de raízes, colmos e solo rizosférico de plantas de milho coletadas no Vertisolo do Campo Experimental de Mandacaru (em Juazeiro, BA) e no Argissolo do Campo Experimental de Bebedouro (em Petrolina, PE), utilizando as três metodologias em estudo. Para a metodologia 1, foram obtidos 229 isolados, para a metodologia 2, 72 e para a metodologia 3, 104 bactérias. Destes, 182 foram obtidos das raízes, 152 da parte aérea (colmo) e 71 do solo rizosférico.(Tabela 1)

A grande área superficial das raízes é um habitat para abrigar uma grande densidade e diversidade de bactérias, desde saprofíticas a comensais, mutualísticas, simbióticas, endofíticas e patogênicas (WELBAUM et al., 2004), e esse maior número de bactérias nas raízes, provavelmente, se deve ao fato desta parte da planta representar o primeiro local de entrada dos endofíticos (LODEWYCKX et al., 2002).

No entanto, houve um número considerável de isolados extraídos do colmo das plantas, que para KOOMNOK et al. (2007) é possível que o colmo represente um ambiente menos competitivo para as bactérias diazotróficas, podendo estas se beneficiar dos fotossintatos primeiramente em comparação com micro-organismos da raiz.

Tabela 1: Número de isolados bacterianos em plantas de milho coletadas em Mandacaru-BA e Bebedouro-PE

Área	Metodologia	Parte da Planta		
		Raiz	Colmo	Solo
Mandacaru	1	58	75	-
	2	13	6	14
	3	20	9	27
Bebedouro	1	48	48	-
	2	25	4	10
	3	17	9	20
Total		182	152	71

As bactérias diazotróficas endofíticas foram caracterizadas fenotipicamente e, posteriormente agrupadas, considerando-se as características apresentadas, através de dendrogramas de similaridade, onde foram realizados seis, um para cada área da metodologia estudada.

Considerando uma similaridade de 80% entre as bactérias, para a **metodologia 1** constatou-se a formação de 60 grupos fenotípicos para cada área. Para o campo experimental Bebedouro-PE, os grupos 25 e 44 foram os que apresentaram maior número de indivíduos, com 6 e 7 indivíduos. Para Mandacaru-BA os grupos 45, 42 e 29 apresentaram o maior número de isolados, com 8, 9 e 10 indivíduos. 68% dos isolados apresentaram tamanho entre 1-2mm de diâmetro, seguidos de 25% e 7% para <1 e >2, respectivamente. 83% apresentaram forma circular, 95% heterogêneas quanto ao aspecto e 76% translúcida. Para a característica cor das colônias, apresentaram verde, laranja, vermelho, branca, rosa, creme e amarelo que apresentou maior número de isolados, resultando em 44% das demais. Quanto a elevação, 40% apresentaram .70% dos isolados apresentaram muco, no entanto, apenas 18% apresentaram o mesmo em grande quantidade (**Anexo 1**).

Para a **metodologia 2** o procedimento de isolamento e purificação, foram obtidos 72 isolados bacterianos, dos quais 11% apresentaram tamanho maior que 2 mm, 41% menor que 1 mm e 48% entre 1 a 2 mm. No que diz respeito a forma, 84% apresentam forma circular. Quanto ao aspecto da colônia 100% foram homogêneas. Para a característica cor da colônia, foram considerados 69% para a cor creme, 16%

amarela, 10% para laranja, 3% para marrom e 1% para branca. Quanto as outras características 39% apresentaram elevação e 63% apresentaram muco, sendo que 37% com pouco e 26% muito muco.

O agrupamento dos isolados no dendrograma de similaridade, de acordo com suas características culturais, formou 24 grupos com mais de 80% de similaridade para isolados obtidos de Bebedouro-PE, dos quais 15 são formados por apenas um indivíduo. Os grupos 7 e 10 apresentaram a maior quantidade de indivíduos, com 5 e 4 solados, respectivamente. Para os isolados obtidos de Mandacaru, foram formados 20 grupos, dos quais 15 são formados por apenas um indivíduo. Os grupos 8 e 20 apresentaram a maior quantidade de indivíduos, com 5 e 6 solados, respectivamente. **(Anexo 2)**

Em princípio, os resultados mostram que a alta diversidade fenotípica e a baixa similaridade dos isolados, demonstram bactérias diferentes. A totalidade dos isolados apresentou o indicativo de fixação de nitrogênio, pela formação de película de crescimento, onde 47 isolados amplificaram o gene *nifH*. Os genes de fixação de nitrogênio são encontrados em diversos grupos filogenéticos (AFFOURTIT et al. 2001). Dentre eles, o *nifH* é um dos mais antigos e funcionais (ROSADO et al. 1998) e sua amplificação por meio de primers degenerados é uma ferramenta útil para confirmar fixadores potenciais (ZEHR et al. 1996). Novos estudos estão sendo conduzidos com os representantes de cada grupo genotípico para verificar sua capacidade em promover o crescimento vegetal em plantas de milho.

Considerando os parâmetros morfofisiológicos dos isolados da **metodologia 3**, dos 102 isolados estudados para ambas as áreas 52% exibiram crescimento rápido e apenas 9% acidificaram o meio de crescimento. 42% apresentaram tamanho >2 mm de diâmetro. Quanto a cor das colônias 5%, 15% e 79%, sendo azul, amarelas e creme, respectivamente. Um total de 64% foram classificadas como heterogêneas, Com relação à forma, 60% apresentaram forma circular e com relação à transparência 70% translúcidas. Todas as colônias apresentaram elevação e presença de muco. Quanto a quantidade e tipo de muco, 90% apresentaram muito muco e 94% do tipo viscoso. **(Anexo 3)**

A maioria das características morfológicas da colônia, como tamanho, produção de muco e elevação estão inter-relacionadas, observando que as colônias que apresentaram crescimento rápido em sua maioria, produziam muito muco. A característica de alta produção de muco vem sendo descrita por vários autores como um mecanismo de adaptação e sobrevivência a condições edafoclimáticas (XAVIER et

al.,1998), uma vez que os mesmos podem formar uma capa protetora à colônia de rizóbio no ambiente natural.

Foram formados 56 grupos para isolados do Campo Experimental de Mandacaru, e 46 do Campo Experimental de Bebedouro, sendo que o grupo 34 apresentou o maior número de isolados, e os grupos 10 e 24, ambos com 3 isolados, respectivamente Mandacaru e Bebedouro, todos apresentando 80% de similaridade.

Os resultados das características culturais das bactérias obtidos por meio da metodologia 3 mostraram que há grande dissimilaridade entre os grupos e que a comunidade de rizóbios de feijão-caupi que habitam os tecidos do milho é bem diversificada e pode ser influenciada por fatores como o tipo de solo e parte da planta de origem, por exemplo. O Feijão-caupi é tido como uma planta promíscua, ou seja, capaz de nodular com uma ampla diversidade de rizóbios do solo. Da mesma forma, o feijoeiro comum, planta utilizada como isca no mesmo experimento e que não apresentou nódulos, é considerado promíscuo (THIES et al., 1991). Assim, a elevada diversidade de rizóbios nodulando o feijão-caupi obtidos utilizando como inoculante os extratos de plantas de milho, pode estar relacionada às gramíneas a se associar com diversos representantes do gênero *Bradyrhizobium*, como já avaliado por técnicas independentes de cultivo para o capim-elefante (VIDEIRA et al., 2006) e utilizando o feijão-caupi como plantas-isca inoculando-se extratos de cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014). HAMEED et al. (2004) discutem que as características morfo-fisiológicas podem revelar uma ampla diversidade de populações de rizóbios, e que, normalmente, estão relacionadas com os estudos em nível molecular e o seu posicionamento taxonômico.

5.2 Caracterização molecular dos isolados

5.2.1 Amplificação de fragmentos dos genes simbióticos como ferramentas para seleção prévia dos isolados

Após a extração do DNA, todos os isolados da coleção obtidos por meio da metodologia 1 e 2, foram submetidos à amplificação do gene *nifH*. Para as bactérias obtidas por meio da metodologia 1, apenas 9 dos 232 isolados avaliados apresentaram amplificação para o fragmento correspondente ao gene *nifH*. Desta forma, este não foi o critério utilizado para a seleção de bactérias obtidas por meio desta metodologia para as avaliações posteriores. A baixa frequência de bactérias associativas obtidas direto de

meios sólidos e positivas para a amplificação de um fragmento do gene *nifH* já foi demonstrado para bactérias do arroz-silvestre na Amazônia brasileira. Neste estudo, FERNANDES JÚNIOR et al. (2013) avaliaram que de 998 isolados obtidos, apenas 38 amplificaram um fragmento do gene *nifH* após reação de PCR utilizando o par de iniciadores PolF e PolR. Para a metodologia 2, dos 72 isolados avaliados, 33 da área de Mandacaru (45%) e 14 de Bebedouro (20 %) amplificaram o gene *nifH* na reação de Nested-PCR utilizando como par de iniciadores para a segunda reação, aquele descrito por SOARES et al. (2006). Um maior número de bactérias com amplificação positiva para este fragmento era esperado para a metodologia 2, uma vez que estes isolados são potencialmente diazotróficos por apresentarem a capacidade de formar película em condições microaerófilas quando inoculados em meio semissólido (BALDANI et al., 2014).

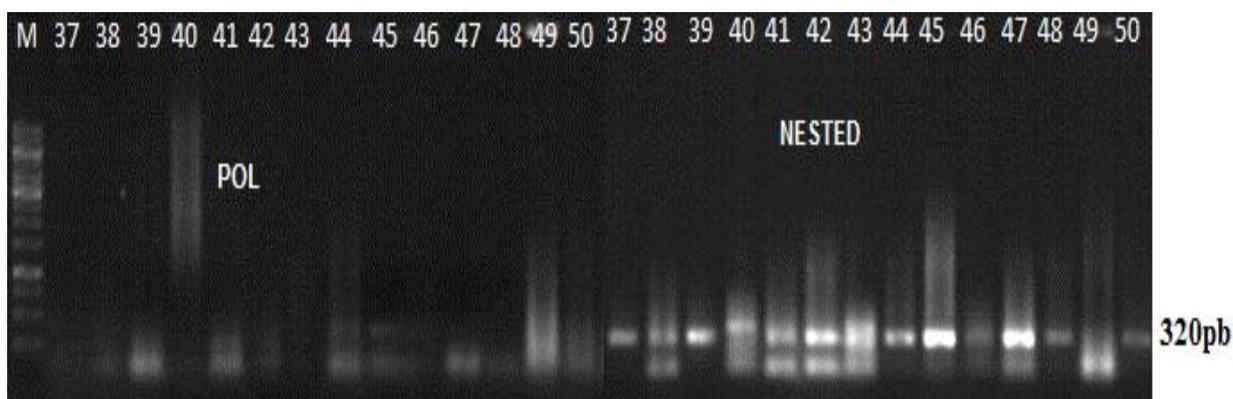


Figura 2: Amplificação do gene *nifH* com os iniciadores PolF e PolR na primeira reação e *nifHF* e *nifHR*(nested) de isolados de bactérias da metodologia 2.

Para as bactérias obtidas a partir do isolamento de nódulos de feijão-caupi (metodologia 3), a escolha das bactérias que seriam avaliadas nas próximas etapas do trabalho foi feita por meio da realização da reação de duplex-PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*, conforme metodologia estabelecida por FERNANDES JÚNIOR et al. (2013). Nestas reações, dos 102 isolados avaliados, 89 foram positivos para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*.

Esta abordagem metodológica permite a redução do número de isolados que serão testados em ensaios de autenticação em condições de casa de vegetação, ou ainda, permite a seleção de bactérias que podem ser testadas diretamente nos ensaios para a avaliação da eficiência simbiótica (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013).

Recentemente, a amplificação individual dos genes *nifH* e *nodC* foi proposta como avaliação prévia da capacidade diazotrófica e nodulífera de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas (MOTHAPO et al., 2013), entretanto, a reação em duplex pode resultar numa economia de tempo e de recursos uma vez que ambas amplificações podem ser conduzidas de forma simultânea.

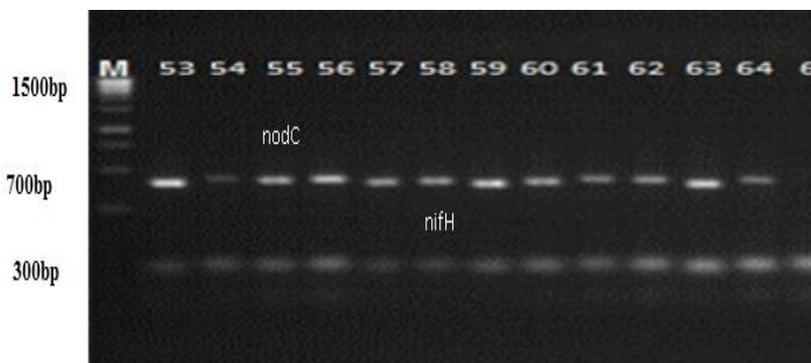


Figura 3: Amplificação do gene *nifH* e/ou do gene *nodC* em isolados selecionados da metodologia 3, no método Duplex-PCR.

Desta forma, para as avaliações subsequentes foram selecionados 47 isolados obtidos a partir da metodologia 2 (meio semissólido) por apresentarem amplificação positiva para um fragmento do gene *nifH* e 89 isolados obtidos a partir de nódulos de feijão-caupi inoculados com extratos de plantas de milho (metodologia 3). Devido à baixa incidência de bactérias obtidas a partir da inoculação dos extratos de milho diretamente em placas de Petri (metodologia 1), utilizou-se como critérios para a seleção destes isolados a capacidade de produzir AIA em meio Dyg's Líquido suplementado com triptofano, onde 104 dos 229 isolados foram selecionados por esse critério. De modo geral, após as avaliações, 238 isolados foram selecionados para as demais avaliações, representando 58% das bactérias obtidas inicialmente. (Tabela 2)

Tabela 2: Isolados selecionados após caracterização molecular e capacidade de produzir compostos indólicos em bactérias isoladas de milho em solos do Semiárido.

Isolados Selecionados para testes de Promoção de Crescimento			
Área	Metodologia		
	1	2	3
Mandacaru	39	33	40
Bebedouro	65	14	49
Total	104	47	89

5.3 Variabilidade genética das bactérias por meio da técnica de Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).

Todas as bactérias selecionadas foram avaliadas quanto à sua variabilidade genética por meio da técnica de ARDRA com o emprego das endonucleases *HinfI*, *HhaI* e *MspI*. Nesta oportunidade foi possível observar que os produtos de amplificação digeridos apresentavam soma dos tamanhos moleculares de em torno de 1400pb, indicando não haver contaminação no DNA extraído destas bactérias.

Na análise de restrição, para as bactérias obtidas por meio da metodologia 1, 68 dos 104 isolados amplificaram o gene 16S rRNA. No dendrograma de similaridade. Bactérias oriundas da variedade BRS Caatingueiro do Campo Experimental Mandacaru não amplificaram o gene 16S (35%), por isso não foram inseridas no Ardra. Os isolados foram agrupados tornando possível verificar a presença de 7 grandes grupos distintos. O grupo 1 com aproximadamente 43% de similaridade agrupou 12 isolados, divididos em três subgrupos com 100% de similaridade, todos oriundos do Campo Experimental de Mandacaru, e da cultivar BRS Gorutuba. O grupo 1A agrupou 7 isolados, todos extraídos do colmo das plantas de milho. O grupo 1B, com três isolados e 1C com três isolados, obtidos de colmo e raiz. (**Figura 4**)

O agrupamento 2, composto por 11 isolados, de localidades, cultivares e partes da planta diferentes, apresentou 4 subgrupos com 100% similaridade, com o 2B, 2C e 2D com 3 isolados cada e 2B formado por duas bactérias. O grupo 3 apresentou 41% de similaridade, com 11 isolados, e apenas um subgrupo 3A (PBG64, PBG61), com 100% de similaridade e obtidos da raiz. O agrupamento 4, com 49% de similaridade, foi formado por 17 isolados e 6 subgrupos com 100% de similaridade. O subgrupo 4A que

abrigou os isolados PBC49, PBC46, PBC45, PBC48 e PBC47 e o subgrupo 4B, que englobou as bactérias PBC41, PBC40 e PBC39. Todos isolados destes subgrupos foram obtidos do colmo das plantas de milho da variedade BRS Caatingueiro e cultivadas no Argissolo do Campo Experimental de Bebedouro. E os demais grupos foram formados com 2 isolados cada. O grupo 5 com aproximadamente 40% de similaridade, formado por 17 isolados 3 subgrupos. O 5A com 5, 5B com 3 isolados. O grupo 6 e 7 apresentaram 100% de similaridade com 2 e 4 isolados respectivamente. Nestes dois últimos grupos não foi possível identificar um padrão de distribuição nem quanto à variedade de origem, nem quanto ao local ou partes das plantas de obtenção das bactérias. **(Figura 4)**

Ao analisar a formação o dendrograma, é possível observar que todos os isolados apresentaram em torno de 20% de similaridade pelo coeficiente de Jaccard e que houve a formação de 13 subgrupos raros, ou seja, com apenas um indivíduo. Na topologia do dendrograma, observa-se a maior influência para formação dos grupos nessa metodologia foi da localidade, influenciada pelo tipo e características de fertilidade do solo e, posteriormente por variedade de origem e por parte da planta. Os grupos 2; 3; 5; 6 e 7 apresentaram predominância de bactérias originárias de plantas cultivadas no Argissolo Vermelho-Amarelo do Campo Experimental de Bebedouro, enquanto no grupo 1 predominaram bactérias originárias de plantas de milho cultivadas no Vertissolo do Campo Experimental de Mandacaru. Dentro dos grupos, a dicotomização subgrupos pôde ser observada devido tanto ao genótipo do milho, como por exemplo para o grupo 4, onde os subgrupos 4A; 4B e 4F são formados por bactérias oriundas da variedade BRS Caatingueiro e os subgrupos 4C e 4D são formados por bactérias oriundas do genótipo BRS Gorutuba

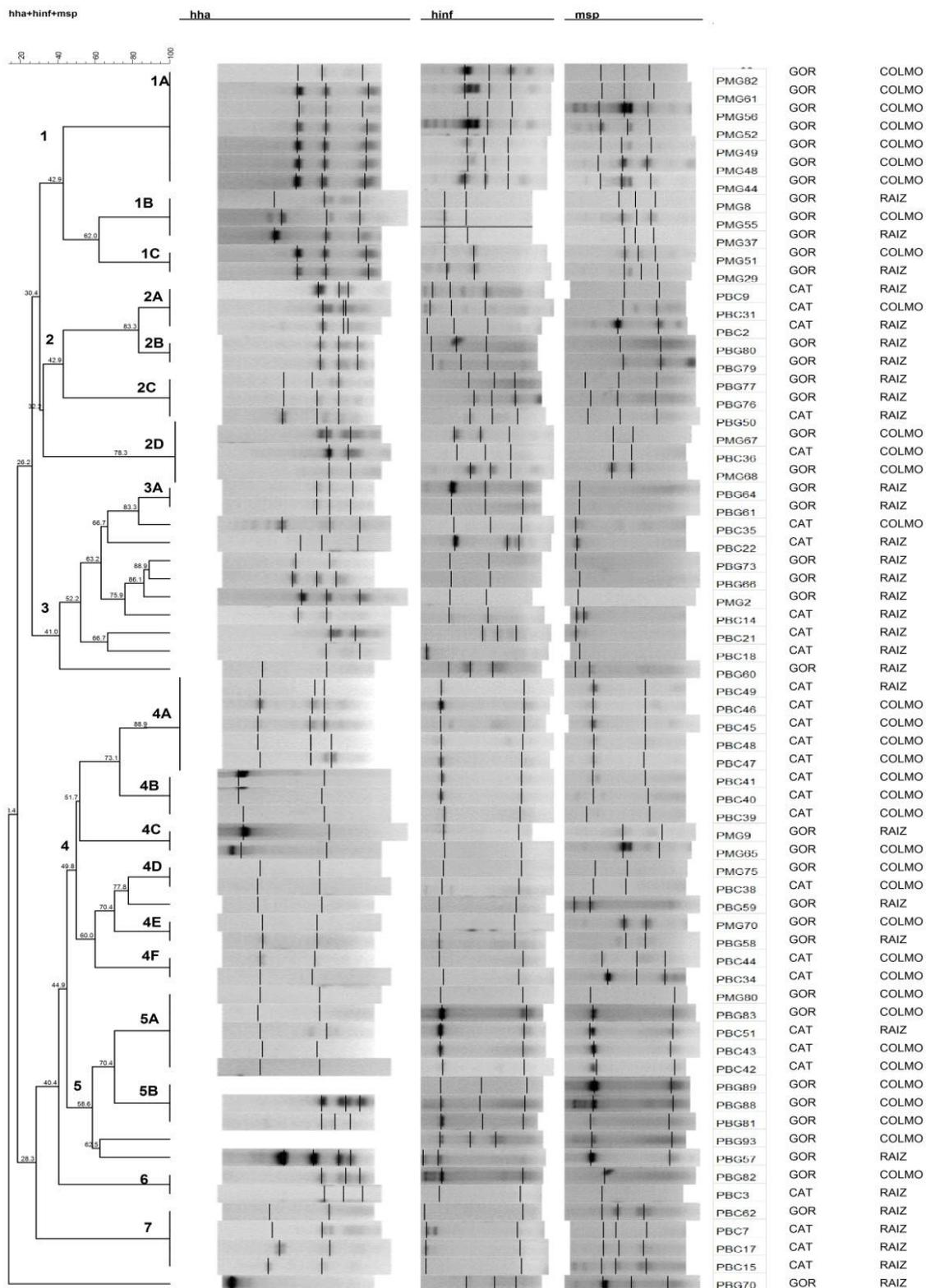


Figura 4: Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de milho da metodologia 1, por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição *Hinf*I, *Hha* e *Msp*. Gor: Gortuba/ Cat:Caatingueiro.

Estes resultados corroboram com REIS JÚNIOR et al., (2004), que analisaram por meio de ARDRA, o efeito do genótipo da planta e do sítio de coleta na diversidade intraespecífica de isolados de *Azospirillum amazonense*, oriundos de associações com raízes de *Brachiaria*. DEY. et al. (2012) relatam que o tipo de solo pode ser um fator determinante na estrutura das comunidades microbianas do solo. Características como textura e estrutura, teores de matéria orgânica, estabilidade de microagregados, pH e macro e micronutrientes podem determinar os nichos microbianos. Entretanto, o efeito do genótipo não pode ser negligenciado, uma vez que pode ser importante na determinação da comunidade de bactéria associada quando as espécies são cultivadas em um mesmo solo, conforme já demonstrado por RODRIGUEZ-BLANCO et al. (2015) para variedades de milho contrastantes.

Para as bactérias obtidas por meio do isolamento a partir do meio semissólido, (metodologia 2), foram avaliados os 72 isolados no ARDRA. Após a amplificação e digestão das amostras, a construção do dendrograma de similaridade, foi possível observar que todos os isolados apresentaram em torno de 35% de similaridade e que houve a formação de 13 subgrupos raros. Foi possível observar a formação de 6 grupos consisos. O primeiro agrupamento, com em torno de 50% de similaridade, foi formado por 22 isolados, com os subgrupos 1A com 7 e 1B com 3 isolados, todos oriundo da área do Campo Experimental de Bebedouro . O subgrupo 1C com três isolados, e os demais com 2 isolados. O grupo 2, com 52% de similaridade, foi formado por 5 isolados, e um subgrupo com 100% de similaridade, com 2 isolados, extraídos da raiz e do solo Argissolo.(Figura 5)

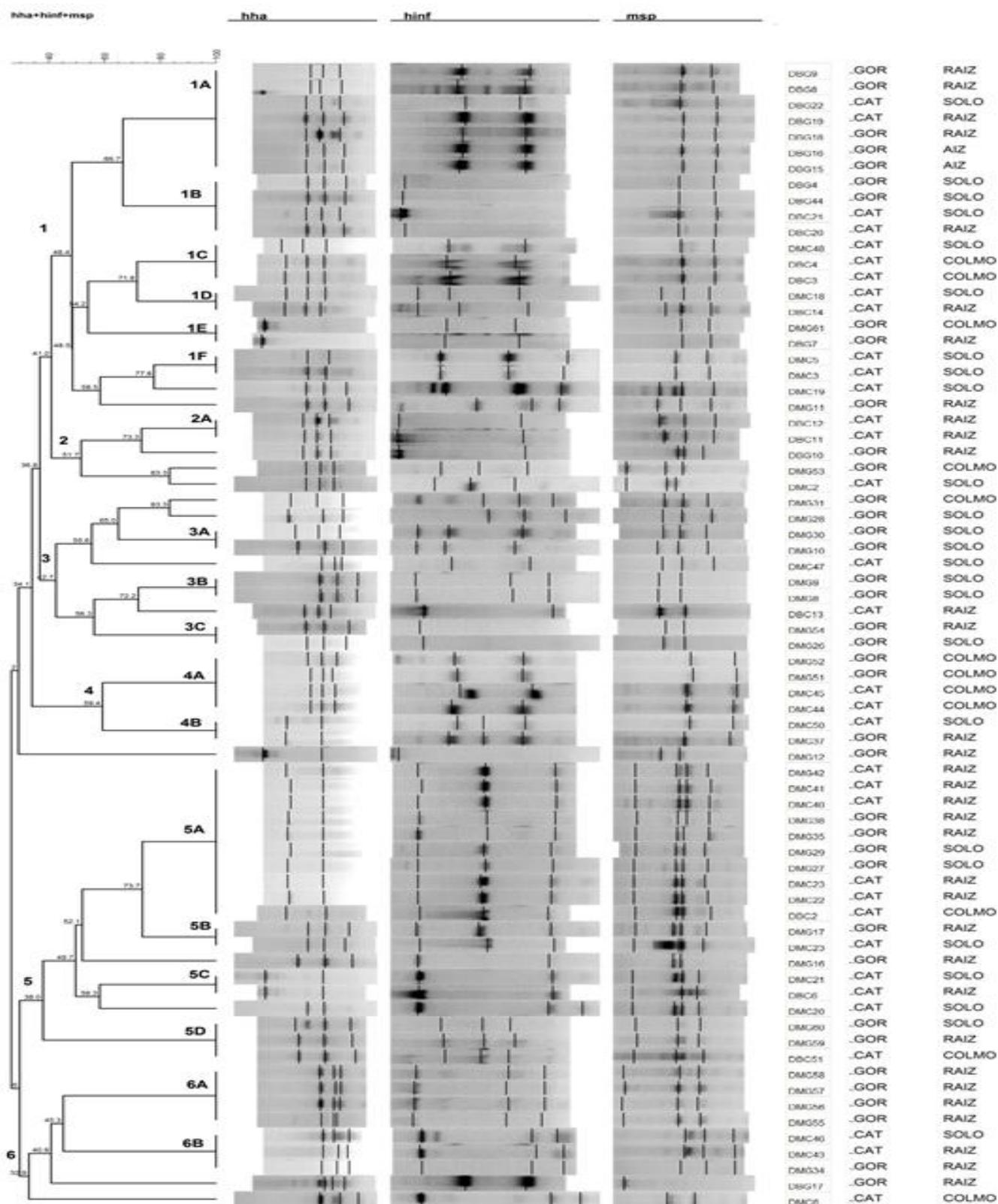


Figura 5: Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de milho da metodologia 2, por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição *Hinf*I, *Hha* e *Msp*. Gor: Gorutuba/ Cat:Caatingueiro.

O grupo 3, composto por 10 isolados, com 43% de similaridade, formando 3 subgrupos com isolados que apresentaram 100% de similaridade. Todos estes subgrupos foram formados por bactérias provenientes de plantas cultivadas no Vertissolo de Mandacaru. O agrupamento 4 formado por 6 isolados e 2 subgrupos, sendo o subgrupo 4A com isolados do colmo e o 4B, com isolados de raiz e solo, todo oriundos do Vertissolo de Mandacaru. O grupo 5, formado por 19 isolados, e 4 subgrupos, apresentando grande variabilidade. O subgrupo 5A com 10 isolados, o subgrupo 5B e 5C com dois e 5D com 3 bactérias. O último grupo apresenta 9 isolados, com dois subgrupos com 100% de similaridade, o 6A com 4 e o 6B com 3 isolados, todos obtidos do Vertissolo do Campo Experimental do Mandacaru. (Figura 5)

Da mesma forma que o observado para as bactérias obtidas por meio da metodologia do cultivo direto em meio meio Dyg's sólido, a área de origem dos isolados teve forte influência no agrupamento das bactérias por meio da técnica de ARDRA, bem como a variedade de origem e a parte da planta que de onde as bactérias foram isoladas. Por exemplo no agrupamento 1, é possível verificar que há a predominância de isolados oriundos do Argissolo do Campo Experimental de Bebedouro, uma vez que dos 21 isolados, 16 são originários desta área. No subgrupo 1A, onde todos os sete isolados são originários desta área, cinco foram isolados de plantas do genótipo BRS Gorutuba, havendo tanto isolados de raiz, como de solo rizosférico.

Para outro grupo abundante, o grupo 5, nove dos 10 isolados do subgrupo 5A são originários de plantas crescidas no Vertissolo de Mandacaru. Dentre estas não há predominância por variedade de milho de origem, entretanto sete bactérias são endofíticas das raízes das plantas e duas de solo rizosférico, não havendo bactérias dos colmos das plantas neste subgrupo.

Considerando os isolados potencialmente diazotróficos, formadores de películas em condições microaerófilas de meios semissólidos, tanto os solos de origem como os genótipos de milho avaliados podem influenciar na diversidade de bactérias obtidas. No estudo conduzido por SILVA et al. (2013), a técnica de ARDRA foi utilizada para avaliar a diversidade genética de bactérias diazotróficas obtidas de plantas de milho, oriundas de dois solos contrastantes no cerrado de Roraima e o agrupamento dos isolados foi bastante condizente com a área onde as plantas haviam sido cultivadas e também com os genótipos utilizados, da mesma forma como observado neste estudo. Além do milho, avaliações da diversidade genética de bactérias cultiváveis de outras

gramíneas como a cana-de-açúcar (BENEDUZZI et al., 2013), o trigo, a aveia e a cevada (VENIERAKI et al., 2011), dentre outras, a influência dos solos onde os hospedeiros são cultivados, bem como dos genótipos de origem, são observados.

Para as bactérias isoladas por meio da metodologia 3, inoculação dos extratos de milho em plantas de feijão-caupi como plantas-isca, 89 isolados foram avaliados quanto à sua variabilidade genética por meio da técnica de ARDRA. Esta abordagem metodológica foi a que resultou na menor similaridade genética total dentre os isolados, uma vez que todas as bactérias apresentaram, aproximadamente, 10% de similaridade pelo coeficiente de Jaccard. Além da baixa similaridade total destas bactérias, é possível observar a formação de 52 grupos com apenas um isolado, indicando a elevada variabilidade genética das bactérias obtidas por meio desta abordagem metodológicas.(Figura 6)

Na análise do dendrograma é possível observar que foram formados 10 grupos concisos. O primeiro grupo, formado por 10 isolados, divididos em dois subgrupos (com mais de 1 isolado), ambos com dois isolados, apresentando 100% de similaridade. O grupo 2 com 25% de similaridade, agrupou 11 isolados, e apenas dois isolados, apresentaram 100% de similaridade, sendo de áreas diferentes, porém provenientes de solo rizosférico. O grupo 3 agrupou 5 isolados com 30% de similaridade, todos oriundos de plantas adubadas com nitrogênio. O grupo 4 apresentou 8 isolados, com um subgrupo com 2 isolados com 100% de similaridade, sendo ambos do Argissolo do Campo Experimental de Bebedouro. O grupo 5 agrupou 10 isolados. Houve a formação de dois subgrupos, com 100% de similaridade. O grupo 5A formado por dois isolados obtidos de áreas diferentes, porém oriundos de plantas sob adubação nitrogenada. O grupo 5B, também formado por dois isolados endofíticos de raiz, de locais diferentes e não adubados com N (Figura 6).

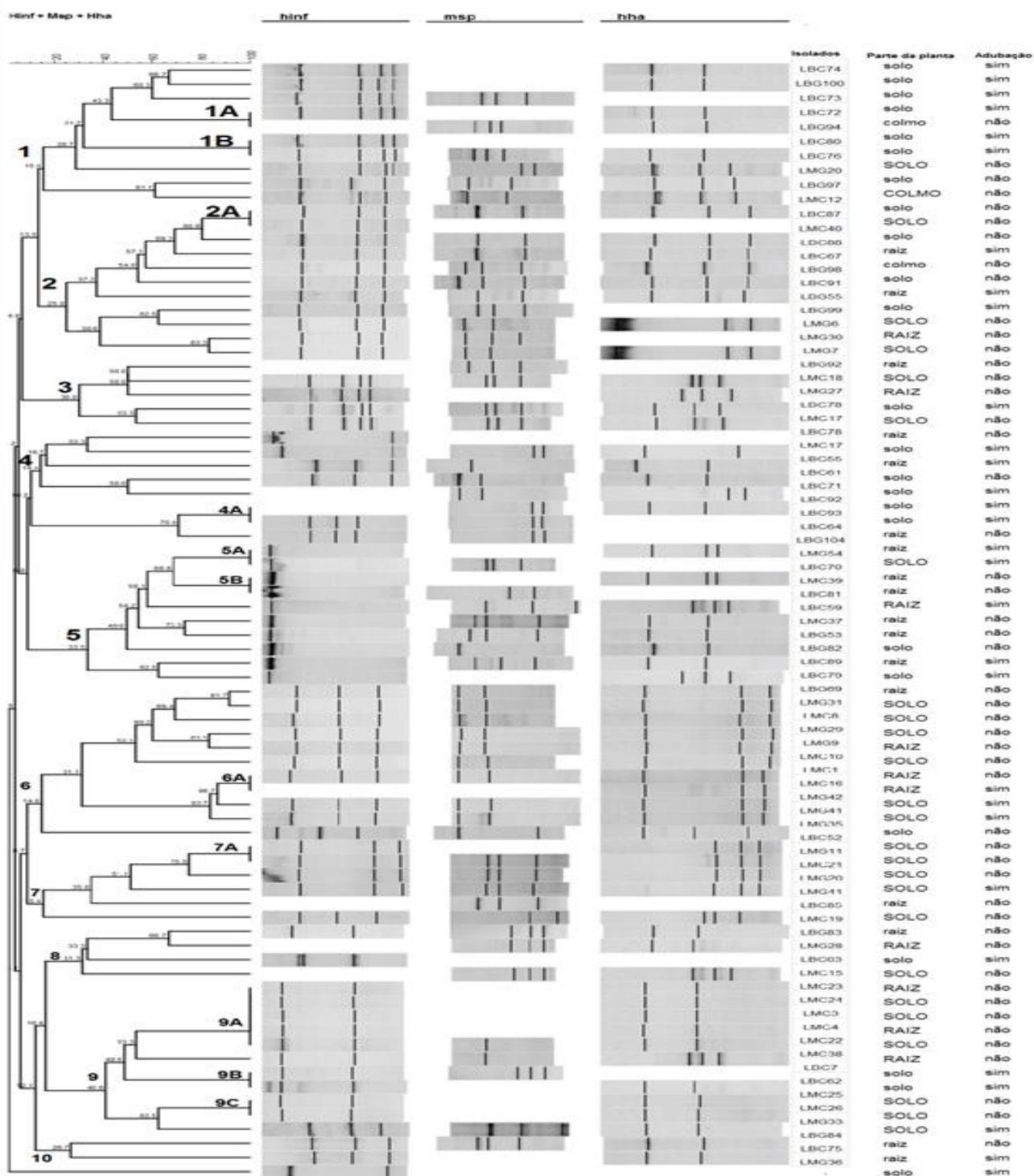


Figura 6: Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de milho da metodologia 3, por meio da técnica de ARDRA-16S rDNA, utilizando as enzimas de restrição *Hinf*I, *Hha*I e *Msp*I. Gor: Gortuba/ Cat:Caatingueiro. Adubação: Sim/ Não

O agrupamento 6 formado por 11 isolados com 15% de similaridade, e apenas dois isolados apresentaram 100% de similaridade, sendo ambos provenientes das raízes e plantas cultivadas no Vertissolo do Campo Experimental de Mandacaru. O grupo 7 compreendeu 6 isolados, com 16% de similaridade. Houve a formação de um subgrupo com dois isolados com 100% de similaridade, obtidos do Campo Experimental de Mandacaru do solo rizosférico das plantas de milho e sem adubação.

Na formação do grupo 8, foi possível observar a presença de 4 isolados com 31% de similaridade e o grupo 10 com 3 isolados com 27% de similaridade. O grupo 9 formou englobou 11 isolados com 41% de similaridade, formando 3 subgrupos. O subgrupo 9A foi formado com 5 isolados, todos obtidos do Vertissolo, sem adubação e da cultivar BRS Caatingueiro. Os subgrupos 9B e 9C composto por 2 isolados cada, todos isolados de solo rizosférico, no entanto de locais e adubações diferentes.

O isolamento de rizóbios colonizando tecidos de gramíneas têm ocorrido nos últimos anos e estudos conduzidos nos últimos anos têm colaborado para o melhor entendimento da taxonomia destas bactérias e espécies novas, principalmente pertencentes ao gênero *Rhizobium*, como por exemplo *R. oryzae*, isolado de uma espécie silvestre do gênero *Oryza* na China (PENG et al., 2008). Outros estudos, inclusive conduzidos no Brasil, empregando a metodologia tradicional de isolamento dos diazotróficos associativos por meio de meios semissólidos sem fontes de N, também têm obtido isolados classificados como *Rhizobium* (SOUZA et al., 2013, FERNANDES JÚNIOR et al., 2015, ANTUNES, 2016).

Entretanto, conforme já discutido anteriormente, os *Rhizobium* que provavelmente estão alojados nos tecidos do milho não são capazes de nodular um de seus hospedeiros preferenciais, como foi observado para o feijoeiro-comum. Esse dado indica que os isolados obtidos por meio da metodologia de utilização do feijão-caupi como planta-isca podem ser pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, um de seus microssimbiontes preferenciais, tanto pela capacidade de nodular a planta hospedeira, como pelas características culturais no meio YMA.

Assim, a diversidade de rizóbios habitantes dos tecidos do milho e capazes de nodular o feijão-caupi é bastante elevada, como verificado pela avaliação de sua variabilidade genética por meio da técnica de ARDRA. A utilização desta abordagem para o isolamento de rizóbios nodulantes de feijão-caupi a partir de amostras de tecidos de gramíneas foi proposta de forma pioneira por ROUWS et al. (2014) utilizando amostras de tecidos de cana-de-açúcar trituradas, e inoculadas no feijão-caupi como

planta isca, e pela inoculação direta em placas de Petri contendo meio YMA. Os resultados demonstraram a presença de uma maior abundância e variabilidade das bactérias obtidas por meio da inoculação das amostras de cana no feijão-caupi, se comparadas com aquelas obtidas por meio da inoculação das bactérias em placas contendo o meio de cultura sólido. No presente estudo, resultado semelhante foi encontrado, mesmo utilizando como meio para o isolamento das bactérias o meio Dyg's meio menos seletivo que o meio YMA, e que permite o crescimento de uma maior gama de micro-organismos. As análises dos dendrogramas das três metodologias avaliadas para a obtenção dos isolados bacterianos, demonstrou que a área de origem dos isolados, sob influência das suas características químicas e mineralógicas, foi um fator determinante no agrupamento dos isolados de acordo com a sua variabilidade genética avaliada por meio da técnica de ARDRA. Esses resultados confirmam que características edáficas, influenciam na variabilidade genética dos isolados e que se associam às plantas cultivadas, conforme tem sido demonstrado (SOUZA et al., 2014). LATOUR et al. (1996) demonstraram intensa influência exercida pelo tipo de solo na estrutura populacional de isolados de *Pseudomonas*, sugerindo que as diferentes características ambientais existentes poderiam ser as responsáveis pelo efeito discriminatório apresentado.

5.4 Avaliação dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal “in vitro

5.4.1 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

Os valores da quantificação de AIA produzido pelas bactérias isoladas por meio da metodologia 1 (isolamento direto em placa), demonstraram que dos 104 isolados, 100 apresentaram potencial de produção do AIA. Esta elevada produção para quase a totalidade dos isolados já era esperada pois este foi o critério utilizado de forma preliminar para a seleção dos 104 isolados dentre os 229 obtidos inicialmente. Os valores de AIA com triptofano variaram de 2,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no isolado **PMC69** à 419,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o isolado **PMC23**, ambos obtidos a partir de plantas com adubação nitrogenada. Os isolados PMC23, PMC18, PMC60, PMC22, PMC58, PMC32, PMC19, PMC20, PMC65 todos oriundos do Vertissolo do Campo Experimental de Mandacaru, em Juazeiro, BA, apresentaram os níveis mais elevados de produção de AIA “in vitro”, de acordo com o teste de comparação de médias de Skott-Knott (Tabela 3). Essas bactérias foram obtidas da variedade BRS Caatingueiro e são endofíticas de raízes, com exceção dos isolados PMC60, PMC58 E PMC65 que foram isolados do colmo e obtidos

de um isolado. Comparando com as estirpes de referência utilizadas, (Ab-5 de *Azospirillum brasilense* e BR11417 de *Herbaspirillum seropedicae*), foram bem superiores. (Tabela 3)

Bactérias isoladas de gramíneas apresentam a capacidade de produzir AIA em quantidades variáveis a depender das espécies e das estirpes estudadas (KUSS et al., 2007; SILVA et al., 2013). A correlação positiva entre a produção de AIA in vitro e a efetividade na promoção do crescimento vegetal já foi demonstrada (COSTA et al., 2013), indicando o potencial das bactérias isoladas do milho avaliadas neste estudo.

Tabela 3: Produção de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por bactérias de milho, na presença e ausência de L-triptofano. (Metodologia 1)

Isolados	Parte da planta	Adubação	Com L-triptofano	Sem L-triptofano	Isolados	Parte da planta	Adubação	Com L-triptofano	Sem L-triptofano
PMC23	Raiz	CN	419,67a	81,57c	PBC7	raiz	CN	97,46c	106c
PMC18	Raiz	SN	366,57a	257,53a	PBC43	colmo	SN	94,97c	146,05b
PMC60	Colmo	SN	365,62a	133,24b	PMG10	raiz	SN	93,64c	77,51c
PMC22	Raiz	SN	362,05a	309,43a	PBC16	raiz	SN	92,88c	130,71b
PMC58	Colmo	SN	358a	12,76c	PBC33	colmo	CN	92,28c	73,06c
PMC32	Raiz	CN	328,71a	320,86a	PBC31	colmo	CN	86,89c	0c
PMC19	Raiz	SN	321,33a	524,9a	PMG68	colmo	SN	84,38c	201,8b
PMC20	Raiz	SN	312,52a	202,05b	PBC14	raiz	SN	83,6c	65,02c
PMC65	Colmo	CN	278a	201,81b	PBG54	raiz	SN	76,05c	123,23c
PMC17	Raiz	SN	231,09b	88,48c	PBG58	raiz	SN	76,05c	124,77b
PMC47	Colmo	SN	229,19b	146,09b	PMG70	colmo	CN	74,02c	455,13a
PBC42	Colmo	SN	224,89b	228,55b	PBC40	colmo	SN	72,13c	129,73b
PMC35	Raiz	CN	223,71b	226,33b	PBG50	raiz	SN	70,15c	152,98b
PMC63	Colmo	CN	219,9b	70,86c	PBC19	raiz	CN	70,14c	165,71b
PBG70	raiz	CN	218,1b	52,46c	PMG6	raiz	SN	66,59c	128,46b
PBC48	colmo	CN	209,24b	126,15b	PBG51	raiz	SN	63,23c	2,1c
PMC66	colmo	CN	205,86b	43,95c	PMG55	colmo	SN	57,11c	178,94b
PMC40	raiz	CN	192,76b	210,38b	PBC11	raiz	CN	55,18c	257,57a
PBG53	raiz	SN	185,15b	170,66b	PBG64	raiz	CN	54,26c	29,64c
PBC35	colmo	CN	182,91b	145,61b	PBG80	raiz	CN	53,23c	286,05a
PBC45	colmo	CN	176,93b	188,16b	PBG66	raiz	CN	52,85c	18,87c
PBC46	colmo	CN	174,84b	190,71b	PBG71	raiz	CN	52,72c	134,77b
PBG49	raiz	SN	174,51b	180,16b	PBG68	raiz	CN	49,77c	70,15c
PBC47	colmo	CN	173,84b	155,41b	PBG73	raiz	SN	48,87c	13,95c
PBG63	raiz	CN	166,82b	150,92b	PBG79	raiz	CN	48,36c	320,93a
PBC44	colmo	SN	164,87b	220,9b	PBG59	raiz	SN	47,08c	26,69c
PBG67	raiz	CN	164,26b	16,56c	PBG91	colmo	SN	44c	97,85c
PBC41	colmo	SN	161,67b	44,53c	PBG57	raiz	SN	44,26c	588,1a
PMC21	raiz	SN	161,1b	273,48a	PBG89	colmo	CN	43,49c	242,2b
PBG56	raiz	SN	154,26b	324,52a	PBG60	raiz	SN	43,23c	52,85c
PBG76	raiz	SN	154,26b	176,56b	PBC21	raiz	CN	42,52c	55,12c
PBG77	raiz	CN	151,69b	130,66b	PMG53	raiz	CN	39,72c	55,96c
PMG5	colmo	SN	148,29b	92,99c	PBG90	colmo	SN	38,62c	366,56a
PBG92	colmo	SN	146,57b	194,25b	PMG50	colmo	SN	31,34c	255,61a
PBC39	colmo	SN	139,24b	124,43b	PBC22	raiz	CN	29d	278,75a
PBG82	colmo	SN	137,33b	334,26a	PBG62	colmo	SN	29,76d	231,95b

PBC34	colmo	CN	134,45b	196,59b	PBG83	colmo	SN	25,54d	209,9b
PBG62	raiz	CN	131,95b	46,31c	PMG58	colmo	SN	15,33d	149,42b
PBC2	raiz	SN	130,37b	11,29c	PBG61	raiz	SN	14d	94,77c
PBC49	colmo	CN	130,27b	327,76a	PMG56	colmo	SN	9,94d	201,55b
PBG93	colmo	CN	128,61b	126,05b	PBC18	raiz	CN	8,56d	20,12c
PBG88	colmo	CN	125,28b	305,8a	PMG61	colmo	CN	7,2d	312,75a
PBC38	colmo	CN	122,19b	86,59c	PMG49	colmo	CN	6,97d	14,17c
PBC36	colmo	CN	120,39b	115,8c	PMG37	colmo	SN	5,39d	83,94c
PMG25	raiz	CN	116,27b	99,18c	PMG41	colmo	SN	5,39d	24,42c
PBG85	colmo	SN	115,8b	154,51b	PMG43	colmo	SN	2,95d	194,89b
PBC17	raiz	CN	111,22b	81c	PMC69	colmo	CN	2,46d	0c
PBC29	colmo	CN	104,04b	34,24c	PMG48	colmo	SN	10,36d	63,82c
PMG65	raiz	SN	102,47b	28,58c	PMG80	raiz	CN	0d	193,34b
PBC9	raiz	CN	101,55b	113,06c	PMG44	colmo	CN	0d	230,37b
PBC15	raiz	SN	99,45b	275,61a	PMG27	colmo	SN	0d	245,14a
PBC3	raiz	SN	99,16b	93,25c	PMG8	colmo	CN	0d	136,79b
Controle									
			Abv5	-			54,78c	11,88c	
			BR11417	-			45,38c	15,62c	

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$). Metodologia 1: P-Placa/Metodologia /B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:caatingueiro

Na **metodologia 2** os isolados foram divergentes quanto as suas capacidades em produzir AIA .As bactérias foram avaliadas quanto a produção do AIA com triptofano, e apenas 4 não produziram. Os valores de AIA variaram de $1,15 \mu\text{g mL}^{-1}$ no DMG38 à $428,2 \text{ mL}^{-1}$ no DMC5.Os maiores valores foram obtidos de representantes isolados de solo e sem adubação nitrogenada(DMC5,DMC18,DMG18), não diferindo estatisticamente do DBC1(colmo) e DMC41(raiz).(Tabela 4)Esses resultados mostram que os dois tipos de solo rizosférico habitam microrganismos que liberam substâncias que quando associadas a planta podem trazer benefícios como promoção de crescimento nas plantas. O AIA produzido pelas bactérias poderá auxiliar na promoção de crescimento, extensão da parede celular, aumento das raízes laterais e adventícias, desenvolvimento de frutos, entre outros (TAIZ; ZIEGER, 2002).

Tabela 4: Produção de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de bactérias diazotróficas isoladas de milho, na presença e ausência de L-triptofano.(Metodologia 2)

Isolados	Parte da planta	Adubação	Com L-triptofano	Sem L-triptofano	Isolados	Parte da planta	Adubação	Com L-triptofano	Sem L-triptofano
DMC18	solo	SN	428,2a	43,08b	DBC14	raiz	CN	45,62c	69,49b
DMG18	solo	SN	427,18a	0c	DMC20	solo	SN	43,08c	37,18c
DBC1	colmo	SN	413,69a	372,57a	DMG53	raiz	CN	41,92c	9,74c
DMC41	raiz	CN	334,1a	23,85c	DMC47	solo	SN	33,46c	39,49c
DBC24	raiz	CN	250,1b	191,02b	DMG34	raiz	CN	31,28c	116,41b
DMG29	solo	CN	192,82b	13,33c	DMC6	colmo	CN	30,77c	13,85c
DMC50	colmo	CN	192,69b	26,67c	DMC25	solo	CN	30,38d	190,77b
DMG17	raiz	SN	189,23b	30,51c	DMG28	solo	CN	27,69d	11,8c
DBC11	raiz	CN	184,72b	0c	DMC23	raiz	CN	23,46d	0c
DBG10	raiz	CN	179,85b	30c	DMG9	solo	CN	20,38d	3,08c
DMG35	raiz	CN	169,49b	61,79b	DMC43	raiz	CN	19,23d	56,92b
DBC6	raiz	CN	167,92b	326,92b	DMC24	solo	CN	16,15d	5,9c
DBG15	raiz	CN	166,38b	18,33c	DMG26	solo	CN	12,69d	0c
DBG9	raiz	CN	150,61b	42,82b	DMC48	solo	SN	11,15d	41,28b
DBG7	raiz	SN	115,38c	28,46c	DMC45	colmo	CN	9,23d	246,92b
DMC7	colmo	CN	93,18c	130b	DMC39	raiz	CN	8,2d	55,38b
DBG18	raiz	CN	92,57c	4,62c	DMG51	colmo	CN	4,36d	10,77c
DBC19	raiz	CN	84,85c	28,08c	DMG15	raiz	SN	3,33d	45,64b
DMC40	raiz	CN	72,05c	48,85b	DMG10	solo	CN	2,69d	0c
DBC23	solo	SN	70,62c	109,23b	DMG38	raiz	CN	1,15d	0c
DBC3	colmo	CN	67,54c	49,49b	DMC44	colmo	CN	0d	0c
DBC21	solo	SN	65,62c	56,92b	DMG14	raiz	SN	0d	10,38c
DMG61	colmo	SN	61,54c	0c	DMG59	colmo	SN	0d	0c
DBC42	raiz	CN	60,62c	53,33b	DMG37	raiz	CN	0d	79,49b
DMG13	raiz	CN	49,74c	58,46b					
Controle									
			Abv5	54,78c	11,88c				
			BR11417	45,38c	15,62c				

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% (P<0,05) Metodologia 2:D:Dobereiner(prôpos a metodologia de semissólido)B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:caatingueiro

Para isolados da **metodologia 3**, após confirmar a amplificação no duplex, dos 86 isolados 11 não produziram AIA com triptofano. Os isolados que apresentaram maiores níveis de produção de AIA foram LMC16 e LMG27, ambos isolados das raízes e com adubação nitrogenada, provenientes do vertissolo (Juazeiro-BA), com valores superiores as estirpes usadas para comparação, a 3299 e 3267, suplementados com triptofano. (Tabela 5)

No estudo conduzido por KUMAR e RAM (2012), a capacidade de sintetizar o AIA por cinco estirpes de *Rhizobium* isoladas de nódulos *Vigna trilobata* (L.) Verdec. em meio 79 suplementado com 100 mg L⁻¹ de triptofano variou de 77,48 a 82,89 µg mL⁻¹ entre os isolados. ANJUM et al. (2011), estudando 44 isolados de nódulos de *Vigna radiata* L. observaram que todos foram capazes de sintetizar o AIA, sendo que a produção variou amplamente entre eles (24,3 a 126 µg mL⁻¹) em meio 79 suplementado com triptofano. No presente trabalho, verificou-se que, de maneira geral, a maior síntese de AIA foi obtida quando os meios de cultura foram suplementados com o aminoácido triptofano. Esta resposta pode estar relacionada ao fato do triptofano ser considerado o principal precursor para as vias de biossíntese do AIA por bactérias (SPAEPEN et al. 2007).

Em plântulas de arroz foi verificado que as concentrações de AIA de 43,04 até 101,26 µg mL⁻¹, produzidas por rizóbios isolados de alfafa aceleraram os processos de germinação e crescimento inicial (STROSCHEIN et al., 2011). Apesar de a maioria das bactérias avaliadas nas três metodologias ter expressado a capacidade de síntese de AIA nos meios suplementados com triptofano, os isolados DBC1, PMC22, PMC19, PMG70, PBG57 sintetiza grandes quantidades de AIA sem adição de triptofano.

Os resultados mostram grande variabilidade entre os isolados produtores de AIA, o que indica provável potencial das bactérias quando associadas com plantas de milho, confirmando ainda que o tipo do solo, variedade utilizada, adubação e a parte da planta, se mostraram determinantes para alcançar altos índices de AIA, sugerindo a continuação desses estudos para elaboração de inoculantes, visando à promoção do crescimento de uma ampla diversidade de gramíneas.

Na rizosfera, a produção de AIA pode aumentar o volume de raízes adventícias, o que favorece a absorção de água e nutrientes e este, por sua vez, libera exsudatos para as bactérias no solo. Já na superfície foliar, o fitormônio pode promover o afrouxamento da parede celular, podendo ainda estimular a liberação de açúcares (FRY, 1989; GOLDBERG, 1980).

Tabela 5: Produção de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de bactérias diazotróficas isoladas de milho, na presença e ausência de triptofano (Metodologia 3).

Isolados	Parte da planta			Parte da planta					
	Adubação	Com L-triptofano	Sem L-triptofano	Adubação	Com L-triptofano	Sem L-triptofano			
LMC16	raiz	c/N	525,46a	0b	LBG57	raiz	c/N	44,99c	42,38a
LMG27	raiz	c/N	412,64a	0b	LBC80	solo	s/N	43,66c	0b
LBC62	solo	s/N	302,77b	0b	LBG65	raiz	s/N	43,44c	18,63b
LMG28	raiz	c/N	298,8b	131,73a	LBC58	raiz	c/N	43,22c	16,15b
LMG29	solo	c/N	242,64b	1,98b	LBC56	solo	c/N	42,77c	160,15a
LMG6	solo	c/N	217,26b	115,29a	LBC76	solo	s/N	42,55c	9,95b
LMC26	solo	c/N	182,36b	0b	LBC55	raiz	c/N	42,33c	73,26a
LMC24	solo	c/N	176,72c	0b	LMG37	raiz	s/N	41,87c	7,05b
LBC66	raiz	s/N	142,99c	5,63b	LBC77	solo	s/N	41,44c	17,93b
LBC63	solo	s/N	128,1c	0b	LBC64	solo	s/N	39,66c	0b
LBC70	raiz	s/N	119,22c	41,07a	LMC17	solo	c/N	39,31c	7,07b
LBC72	solo	s/N	113,44c	0b	LBC59	raiz	c/N	37,99c	0b
LBC73	solo	s/N	105,66c	25,29a	LMG34	solo	s/N	37,26c	7,98b
LBC90	solo	c/N	103,88c	22,87a	LMG31	raiz	c/N	36,23c	29,71a
LBG68	solo	s/N	94,99c	23,93a	LMG36	solo	s/N	35,72c	67,07a
LBC87	solo	c/N	83,99c	0b	LMG32	solo	s/N	34,18c	66,62a
LBC61	raiz	s/N	79,44c	19,6a	LBC81	raiz	c/N	31,66c	3,51b
LBC88	solo	c/N	78,55c	0b	LBG86	raiz	c/N	31,66c	15,04b
LMC15	solo	c/N	76,98c	29,76a	LBG83	raiz	c/N	31,33c	33,04a
LBG100	solo	c/N	70,33c	2,97b	LBG96	colmo	c/N	30,99c	6,85b
LBC60	raiz	s/N	65,66c	54,16a	LMC2	solo	s/N	30,08c	40,6a
LBG69	solo	s/N	60,32c	71,27a	LMG31	raiz	c/N	24,44c	20,15a
LBG52	solo	c/N	59,99c	1,09b	LBG98	colmo	c/N	20,16d	4,12b
LBG53	raiz	c/N	59,44c	0,86b	LMC21	solo	c/N	16,97d	13,53b
LBG93	raiz	c/N	59,22c	21,49a	LMC3	raiz	c/N	16,18d	0b
LBG95	colmo	c/N	58,66c	0b	LMG10	solo	c/N	14,13d	0b
LBG54	raiz	c/N	58,55c	4,2b	LMC19	solo	c/N	12,36d	6,4b
LMC10	raiz	c/N	55,66c	19,18b	LMC23	raiz	c/N	6,69d	151,96a
LBC89	solo	c/N	54,33c	3,98b	LMG2	raiz	c/N	5,69d	3,76b
LBG84	raiz	s/N	53,44c	5,96b	LMG33	solo	s/N	4,13d	30,18a
LBC75	solo	c/N	52,55c	40,18a	LMG5	raiz	c/N	12,33d	35,49a
LBC94	solo	c/N	52,55c	5,51b	LMC22	solo	c/N	1,31d	208,42a

LBG99	raiz	c/N	52,55c	0b	LMC4	solo	c/N	0d	16,2b
LBC85	raiz	c/N	51,66c	1,31b	LMG15	solo	c/N	0d	0b
LBG82	raiz	c/N	51,33c	13,07b	LMC26	solo	c/N	0d	0b
LBC79	raiz	s/N	50,99c	0b	LMG14	solo	c/N	0d	0b
LBC71	raiz	s/N	49,88c	0b	LMC13	colmo	c/N	0d	0b
LBC78	solo	s/N	49,44c	1,09b	LMG20	solo	c/N	0d	0b
LBC92	solo	c/N	48,33c	39,6a	LMG35	solo	s/N	0d	0b
LBC91	solo	c/N	47c	0b	LMG11	solo	c/N	0d	89,51a
LBC67	raiz	s/N	46,77c	0b	LMG7	solo	c/N	0d	0b
LBC74	solo	s/N	46,1c	55,73a	LMC18	solo	c/N	0d	0b
LBG97	solo	c/N	45,21c	30,16a	LMC8	solo	c/N	0d	0b

Controle

BR 3267	-	-	62,99c	55,04a
BR 3299	-	-	53,66c	30,6a

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$) Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$). Metodologia 3: L-leguminosa/B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:Caatingueiro.

5.4.2 Solubilização de Tri-fosfato de Cálcio

Quanto a solubilização de fosfato para a metodologia 1, 22% dos 104 isolados testados apresentaram a formação de halo, indicando resposta positiva neste ensaio (Figura 2-5). O maior índice de solubilização foi observada no isolado PBG88 (4,83), no entanto, não diferindo estatisticamente dos isolados PBG82, PBG83, ao 15º dia de avaliação, ambos extraído do colmo, da variedade BRS Gorutuba e de solo Argissolo (Petrolina-PE).

Tabela 6: Capacidade de solubilização de triofosfato de cálcio de bactérias isoladas de plantas de milho no Semiárido. Metodologia 1

Isolado	Índice de Solubilização
PBG88	4,83a
PBG82	4,73a
PBG83	4,63a
PBG71	3,93a
PMG70	3,87a
PBG70	3,53a
PMG80	2,93b
PMC69	2,93b
PMC40	2,83b
PMG48	2,77b
PMG6	2,73b
PMC32	2,53b
PBG93	2,5b
PMG49	2,5c
PMC20	2,1c
PMG10	1,96c
PMG37	1,8d
PMC58	1,66d
PMG41	1,56d
PMG55	1,56d
PMC47	1,53d
PMC19	1,5d
PMC60	1,03e
Controle	
Abv5	1,57c
BR 11417	1,97c

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$). Metodologia 1: P-Placa/Metodologia /B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:caatingueiro

A obtenção de isolados com capacidade de solubilizar fosfatos no solo é uma etapa muito importante na seleção de bactérias para a produção de inoculantes com potencial para serem utilizadas na agricultura (SOUCHIE et al., 2005). Foram descritas como sendo eficientes em solubilizar fosfatos, bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999) e muitas delas utilizadas em inoculantes aplicados na agricultura com sucesso. Até o presente, apenas trabalhos realizados por (MWAJITA et al., 2013) descrevem bactérias diazotróficas isoladas da rizosfera e filosfera de arroz cultivados no Quênia com capacidade de solubilização de P inorgânico.

Na Metodologia 2, a solubilização de fosfato, independente da área e cultura, 55% isolados apresentaram capacidade solubilizadora de fosfato, com a formação do halo translúcido, com destaque para **DMG10** com IS de 2,9 isolado do solo (tabela 6) e com adubação, no entanto não houve diferença estatística com os demais que solubilizaram.

NAIK et al. (2008) testaram 443 linhagens do gênero *Pseudomonas* isoladas de banana e arroz, destas apenas 18% se mostraram capazes de solubilizar fosfato *in vitro*. Comparando com os resultados do presente trabalho, a proporção de bactérias capazes de solubilizar fosfato, encontradas no milho, foi bem maior do que a dos referidos trabalhos, confirmando mais uma vez a forte interação que o milho apresenta para as condições estudadas e para estas variedades, com bactérias solubilizadoras de fosfato.

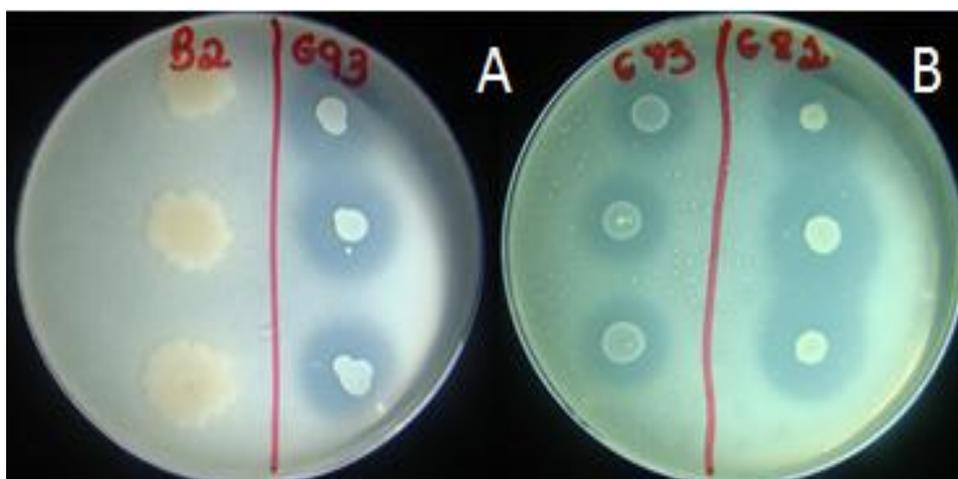


Figura 7: Halo de solubilização e crescimento das colônias de bactérias isoladas de plantas de milho referentes as metodologia 1 e 2.

Tabela 7: Capacidade de solubilização de tri-fosfato de cálcio de bactérias isoladas de plantas de milho no Semiárido. Metodologia 2

Isolado	Índice de Solubilização
DMG10	2,9a
DMG35	2,87a
DMC40	2,8a
DMC45	2,8a
DMG34	2,77a
DMG8	2,7a
DMC39	2,7a
DMG14	2,63a
DMC43	2,63a
DMG26	2,63a
DMG51	2,6a
DMG29	2,57a
DMG53	2,57a
DMG38	2,57a
DMC25	2,53a
DMG13	2,27a
DBG7	2,17a
DMC44	2,17a
DMG15	2,07a
DMG37	1,97a
DMC42	1,93a
DMC23	1,93a
DMG9	1,6a
DBC3	1,4a
DBG9	1,4a
Controle	
Abv5	2,5a
BR 11417	2,95a

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% (P<0,05) Metodologia 2:D:Dobereiner(prôpos a metodologia de semissólido)B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:caatingueiro

Na metodologia 3, 17% dos isolados formaram halo, com valores para os índices desolubilização variando de 1,07 (**LBC81**) proveniente de raiz e com adubação a 4 (**LBC94**), isolados de solo e adubado, que ao ser comparando as referências apresentaram valores superiores BR 3299 (1,3) e BR 3267 (1,47).(Tabela 7)

ALAM et al. (2002), isolaram bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas da rizosfera de variedades de milho e encontraram maior frequência de linhagens com médio índice de solubilização. O milho possui forte interação com bactérias capazes de solubilizar fosfato, uma vez que todas as metodologias estudadas apresentam a ocorrência destes isolados.

A avaliação da capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis por bactérias adaptadas a condições diferentes, quanto ao tipo de solo, clima, cultivar e adubação, são informações fundamentais , para selecionar estirpes que possam contribuir , por meio da maior disponibilização de fósforo solúvel, com o aumento do

crescimento vegetal, e melhorar a eficiência do processo da FBN, beneficiando os cultivos agrícolas.

Tabela 8: Capacidade de solubilização de tri-fosfato de cálcio de bactérias isoladas de plantas de milho no Semiárido. Metodologia 3

Isolado	Índice de Solubilização
LBC94	4a
LBG93	3,8a
LMG35	1,9b
LBG57	1,6b
LMG36	1,57b
LBC71	1,57b
LBC89	1,5b
LBC66	1,5b
LMG37	1,3b
LBG52	1,37b
LBC55	1,27c
LBC67	1,27b
LBC75	1,1c
LBC74	1c
LMC10	1c
LBG68	1c
LBC81	1,07c
Controle	
BR3299	1,3b
BR3267	1,47b

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% (P<0,05). Metodologia 3: L-leguminosa/B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:Caatingueiro.

5.4.3 Produção de Sideróforos

As estirpes foram avaliadas quanto a produção de sideróforos, qualitativamente usando o meio CAS e posteriormente realizando a leitura em espectrofotometria em microplacas de ELISA, com comprimento de onda de 630 nm, utilizando uma curva de EDTA (sequestrante de ferro), para quantificar as amostras.

Das bactérias em estudos apenas 19% para todas as metodologias, produziram sideróforos (Tabela 9). Para a metodologia 1, o isolado PMC19, diferiu estatisticamente dos demais com 2,24 seguido de PMG56, PMG79, PBC40, PMG48, PMG45 e PMG49. 15 isolados da metodologia 2 produziram sideróforos, com destaque para DBC1 com 6,18, proveniente de colmo e sem adubação nitrogenada. Para a metodologia 3, 17 isolados produziram sideróforos, mas o isolado LMG11, foi superior estatisticamente dos demais, provenientes de solo rizosférico e adubados com N.

Os 3 isolados que foram superior as demais, destaca-se o PMC19 e o DBC1 que apresentaram resposta positiva no testes de AIA, solubilização de fosfato e competitivos no teste de antagonismo indicando elevado potencial para produção de inoculantes. 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 micro-organismos fitopatogênicos (DOBBELAERE et al, 2003; DIAS et al., 2014). 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). Neste trabalho, os melhores produtores de sideróforos foram os isolados de locais diferentes, porém adubados com N.

Tabela 9: Quantificação da produção de Sideróforos de bactérias isoladas de milho em solos do Semiárido.

Metodologia 1		Metodologia 2		Metodologia 3	
Isolados	Produção	Isolados	Produção	Isolados	Produção
PMC19	2,24a	DBC1	6,18a	LMG11	6,92a
PMG56	1,13b	BS24	2,06b	LMC26	5,35b
PMG70	0,94b	DMC5	1,81b	LMC24	4,6b
PBC40	0,77b	DMG38	1,79b	LMC17	4,13c
PMG48	0,57b	DMC18	1,42b	LBG94	3,93c
PMG44	0,48b	DMC45	1,14b	LMC22	3,39c
PMG49	0,1b	DMG37	0,75b	LMG29	2,73d
		DBC42	0,7b	LMC3	2,64d
		DBC3	0,66b	LMG35	2,45d
		DMG53	0,5b	LBC67	2,18d
		DBC11	0,38b	LMC4	1,7e
		DMC6	0,2b	LMC18	1,5e
				LMG9	1,43e
				LBC87	0,86e
				LMC23	0,57e
				LMG5	0,38e
				LMG36	0,3e

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% ($P < 0,05$). Metodologia 1: P-Placa Metodologia 2: Dobereiner (própos a metodologia de semissólido) Metodologia 3: L-leguminosa/B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:caatingueiro.

5.4.4 – Antagonismo a *Fusarium oxysporum*

Considerando o possível antagonismo direto dos isolados sobre importante patógenos do cultura do milho , os isolados foram avaliados em relação ao potencial de controlar o crescimento do patógeno .Foi confirmada atividade antagonista ao fungo nas três metodologias estudadas, considerando por antibiose a redução e /ou inibição do crescimento ao fungo patogênico e competição entre os isolados. Assim, para Metodologia 1, 33% foram capazes de inibir o crescimento desse patógeno, enquanto que 33% competiram com o fungo.(Figura 8)

Na atividade antagonista ao fungo para a Metodologia 2 16% inativaram o crescimento do fungo com 50%, 38% e 13% isolados de colmo, raiz e solo, respectivamente. E 46% se mostraram competitivos ao patógeno, sendo que 10% para colmo, 29% solo e 62% raiz. Para a abordagem 3, apenas 3% foram antagonistas ao fungo e 38% mostraram competição ao mesmo. Segundo HARSH et al. (2006), além da

produção de substâncias que conduzem ao incremento da taxa de crescimento vegetal, algumas bactérias atuam como inibidoras de fitopatógenos por meio de competição por nutrientes, exclusão de nicho, indução de resistência sistêmica e produção de metabólitos antifúngicos (Figuras 8 e 9)

Já existem estudos na literatura que descrevem a ação antagonista de algumas bactérias do gênero *Bacillus*, que são relatadas como produtoras de metabólitos com potencial inibidor de fungos como *Fusarium* spp. e *Colletotrichum* spp. (KUMAR; DUBEY, 2012), *Cercospora sojina* (SIMONETTI et al., 2012), *Fusarium graminearum* e *Bipolaris sorokiniana* (SHALI et al., 2010). Destaca-se assim, a importância de estudos para o controle de doenças e promoção do crescimento vegetal a partir da seleção de bactérias endofíticas isolada de plantas.

Figura 8: Distribuição dos isolados obtidos por meio das três metodologias distintas com relação ao desempenho no ensaio de antagonismo “in vitro” contra o patógeno do milho *Fusarium oxysporum*.

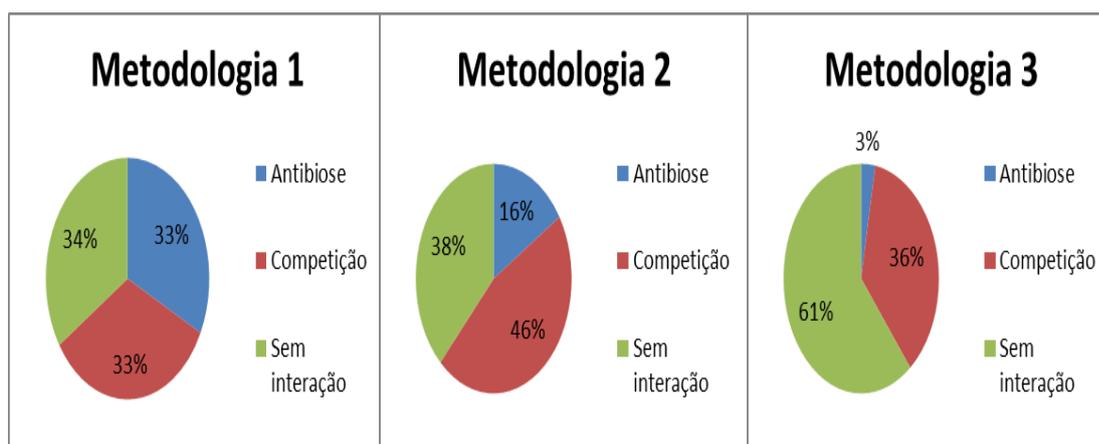
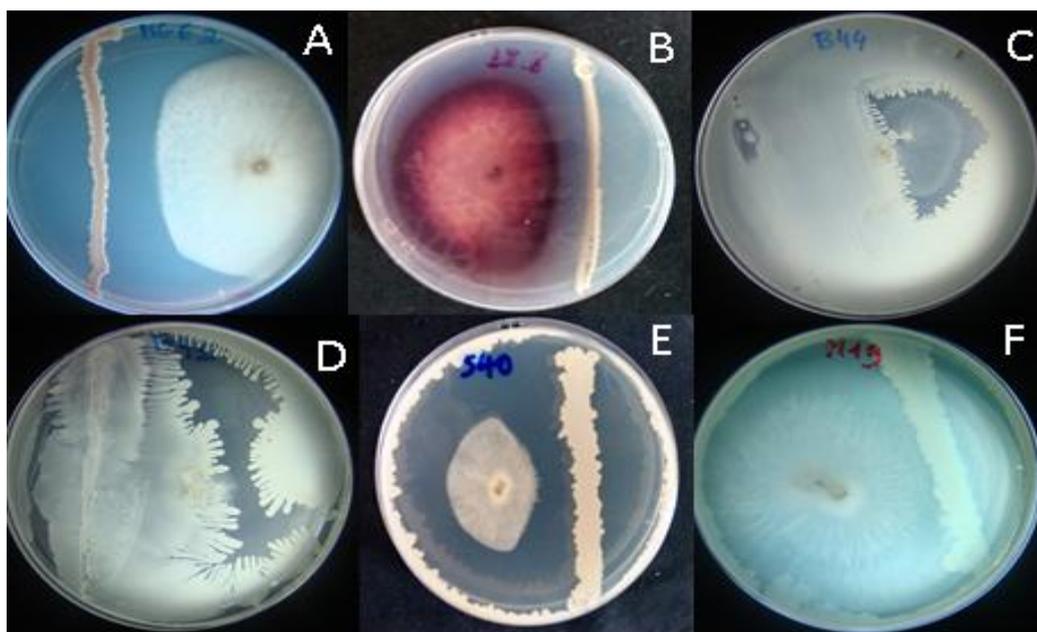


Figura 9: Ensaio de Antagonismo contra o fungo *Fusarium oxysporum*.



A-B-E Isolados se mostrando competitivos ao fungo; C-D: Isolados agindo como antagonistas ao crescimento do fungo. F-Não houve interação entre o isolado e o fungo.

5.4.5 Determinação do Teor de Proteínas em Meio Semissólido

Para determinar a concentração de proteínas nos isolados, que apresentaram formação de película em meio BMGM, foi realizado o teste pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), que mesmo após sua introdução na década de 80, ainda é atual (TEIXEIRA, 1991).

A partir dos valores da absorbância para concentrações conhecidas de BSA, obtidas por espectrofotometria ELISA foi calculada a curva de calibração padrão, que pelo resultado obtido para o meio BMGM, pode-se observar uma boa correlação linear ($R^2 = 0,9892$), na faixa entre 7,5 a 150 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 10). Com a equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de proteínas (mg/mL) provenientes das células, medindo a absorbância da amostra no comprimento de onda de 750 nm.

Dentre os isolados avaliados, os dados mostram que 3 isolados se destacaram dos demais sendo ranqueados no grupo de médias mais elevadas pelo teste de Skott-Knott, sendo eles: DMC40, DBC18 e DMC23, com os valores variando de 0,67 a 0,45(mg/ml) (Tabela 10).

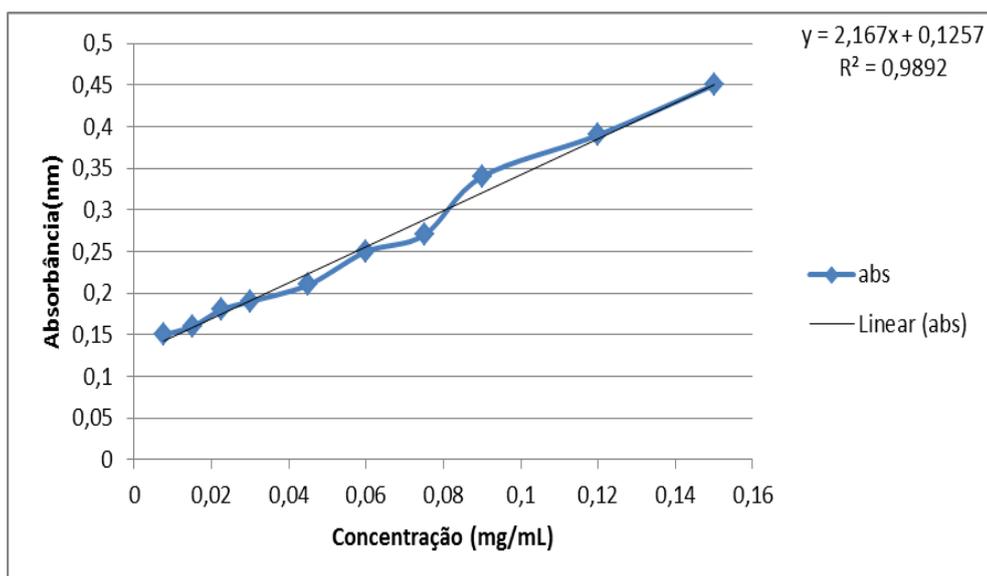


Figura 10– Curva de calibração padrão da concentração de proteína (BSA) em mg/mL no meio semi-sólido BMGM; Absorbância medida à 750nm.

Outros 15 isolados foram ranqueados em no extrato intermediário pelo teste de Skott-Knott. Os outros 31 isolados, junto a estirpe de referência, Ab-V5, foram enquadrados no extrato com as menores médias pelo teste estatístico. Dessa forma, é possível identificar que ao menos 18 isolados são capazes de incorporar N ao meio de cultura em taxas superiores ao observado para a estirpe de referência, indicando elevada capacidade de fixação de N em condições microaerofílicas.

A quantificação de N incorporado ao meio de cultura é uma metodologia alternativa para a avaliação da FBN em meios semissólidos que tem sido empregada em trabalhos recentes de isolamento e caracterização de micro-organismos diazotróficos associativos (SILVA et al., 2013; FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015).

Tabela 10. Quantificação de proteínas totais das amostras de culturas bacterianas crescidas em meio BMGM.

Isolados	Concentração de proteínas totais	Isolados	Concentração de proteínas totais
(mg/ml) em 100 µL de amostra			
DMC40	0,67 ^a	DMG9	0,15c
DBC18	0,5a	DBC3	0,15c
DMC23	0,45a	DMC18	0,15c
DMG26	0,37b	DMC49	0,14c
DMC43	0,32b	DMC41	0,14c
DBC30	0,3b	DMC42	0,13c
DBC23	0,3b	DBC11	0,13c
DMG37	0,27b	DMC6	0,11c
DMC45	0,25b	DBC24	0,11c
DMG35	0,25b	DMG34	0,11c
DBG15	0,24b	DBC21	0,1c
DMC5	0,24b	DBC1	0,09c
DMG10	0,24b	BS33	0,09c
DMC21	0,24b	DBC6	0,086c
DMG14	0,23b	BS31	0,08c
DMG8	0,22b	DMC7	0,06c
DMC20	0,21b	DBG7	0,053c
DMC54	0,21b	DBC13	0,053c
DMG17	0,2c	DMG38	0,046c
DMG13	0,19c	BS14	0,046c
DMG53	0,19c	DMG61	0,036c
DMG52	0,19c	DMG15	0,033c
DBC19	0,18c	DMC25	0,033c
DBC25	0,18c	DMC44	0,013c
DMC24	0,16c	DBG9	0,026c
Controle			
ABV-5		0,1c	

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% (P<0,05) Metodologia 2:D:Dobereiner(prôpos a metodologia de semissólido)B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:caatingueiro

5.5 Ensaio de Promoção do Crescimento Vegetal.

5.5.1 – Eficiência Simbiótica de Rizóbios de Feijão-Caupi (Metodologia 3)

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Semiárido, com objetivo de avaliar a capacidade nódulífera, eficiência simbiótica e/ou capacidade promotora do crescimento vegetal dos isolados provenientes de nódulos de feijão-caupi e que amplificaram o gene *nifH* ou *nodC* na reação de duplex-PCR.

Houve efeito significativo dos tratamentos sobre o NN, MNS, MPAS, MRS, e N total. Os controles negativos (Controle Absoluto e com N mineral) não apresentaram nodulação, indicando que não houve contaminação no experimento. Os controles positivos nodularam bem, evidenciando que as condições foram favoráveis à ocorrência da nodulação e FBN, durante o período experimental. Das 79 estirpes inoculadas em plantas de milho, todas foram capazes de formar nódulos. (Tabela 11).

Com relação a MPAS, os valores variaram de 0,25 a 1,08 (LMC19) g por planta, sendo esses valores obtidos no controle absoluto do tratamento inoculado com a estirpe LMC19, respectivamente. Porém, os isolados a seguir não diferiram estatisticamente do maior valor obtido: LBC93 LMG30 LBC59 LBG54 LBC67 LBG65 LBC92 LMG27 LBG84 LBC76 LBC81 LBC103 MC12 LMC4 LBC70 LBC91 BC77 LBG52 LBC80 LBC85 LMC24 LBC66 LBC75 LBG86 LMG6 LBG55 LBC88 LBC87 LMG5 LMC21 LBG92 LMG29 LMC12 LMC38 LBC56 LMG35 LMC23 LMC26 LMG2 LBG94 e as estirpes BR3299 e BR3267. (Tabela 11)

Quanto a produção de MSR, a estirpe BR 3299 apresentou valor superior aos outros tratamentos, não diferindo estatisticamente dos isolados: LBC93, LBG54, LMG27, LBC103, LBC80, LBC85, LBC66, LBG55, LBC88, LBC87, LMG5, LMC2, LBG92, LMG29, LMC12, LC38, LBC56, LMG35, LMC23, LMC26, LMG2 (Tabela 11)

Para o NN as estirpes apresentaram nodulação superior aos tratamentos não inoculados. Para a MNS não houve diferenças entre os isolados. Em relação ao N total, também não houve diferenças entre as estirpes em estudo.

De um modo geral 53% dos isolados apresentaram eficiência do incremento da MPAS, 52% da MSR e NN no isolado LMC19, mostrando um possível potencial dessas estirpes isoladas de milho. Embora, o maior valor de AIA obtido seja para o isolado LMC16, nesse ensaio, esta característica não mostrou efeito significativo, para as variáveis MPAS e MRS. Na solubilização de fosfato de cálcio, o isolado LMC35

solubilizou, não produziu AIA e mesmo assim, foi significativo para todas as variáveis analisadas. Isolados do Vertissolo e da variedade BRS Caatingueiro. A avaliação de algumas variáveis, como o NN, MNS e MPAS é importante no processo de seleção e recomendação de novas estirpes, pois determinam a eficiência agrônômica das estirpes para serem utilizadas como inoculantes comerciais (BRASIL, 2011).

Estes resultados indicam que as bactérias associadas ao milho podem apresentar eficiência simbiótica em feijão-caupi, indicando que esta pode ser uma estratégia interessante para a obtenção de rizóbios para esta leguminosa. ROUWS et al. (2014) avaliaram que os rizóbios endofíticos de cana-de-açúcar são capazes de renodular o feijão-caupi, entretanto, a eficiência simbiótica destas bactérias não foi avaliada.

Tabela 11: Eficiência simbiótica de rizóbios de feijão-caupi associativos com o milho e obtidos por meio da metodologia 3.

Tratamentos	MSPA	MSR	MSN	NN	N total	Tratamentos	MSPA	MSR	MSN	NN	N total
LMC19	1,08a*	0,57b	0,04a	41b	32,71a	LBG94	0,5a	0,45b	0,06a	67a	12,14a
LBC93	0,84a	1,11a	0,07a	71a	22,7a	LBG83	0,49b	0,51b	0,04a	35b	15,58a
LMG30	0,81a	0,94a	0,09a	77a	20,82a	LBG98	0,47b	0,53b	0,05a	49a	11,82a
LBC59	0,69a	0,56b	0,07a	71a	17,4a	LBC73	0,47b	0,64b	0,05a	53a	10,53a
LBG54	0,69a	0,91a	0,05a	60a	19,22a	LBC90	0,46b	0,58b	0,06a	51a	12,5a
LBC67	0,67a	0,33b	0,07a	64a	21,54a	LMC22	0,46b	0,43b	0,04a	32b	9,67a
LBG65	0,66a	0,52b	0,06a	60a	15,67a	LBC99	0,45b	0,63b	0,15a	45a	12,16a
LBC92	0,65a	0,51b	0,04a	61a	17,7a	LBC71	0,455b	0,46b	0,06a	35b	14,84a
LMG27	0,63a	1,08a	0,08a	72a	13,89a	LMG7	0,45b	0,85a	0,07a	59a	10,82a
LBG84	0,61a	0,59b	0,06a	59a	16,07a	LMC10	0,445b	0,67b	0,04a	35b	12,14a
LBC76	0,61a	0,37b	0,05a	40b	18,18a	LMC25	0,44b	0,3b	0,04a	22b	11,29a
LBC81	0,61a	0,55b	0,03a	28b	16,77a	LBC78	0,43b	0,57b	0,05a	36b	11,26a
LBC103	0,6a	1,01a	0,04a	44a	13,66a	LBG69	0,43b	0,57b	0,06a	38b	8,59a
MC12	0,6a	0,49b	0,08a	52a	13,68a	LMG36	0,43b	0,53b	0,05a	52a	10,57a
LMC4	0,59a	0,55b	0,04a	38b	14,7a	LBC89	0,42b	0,63b	0,06a	68a	7,89a
LBC70	0,59a	0,57b	0,02a	30b	16,7a	LMG11	0,42b	0,64b	0,06a	37b	9,26a
LBC91	0,58a	0,51b	0,07a	80a	12,77a	LBC62	0,42b	0,41b	0,06a	45a	12,88a
BC77	0,58a	0,66b	0,04a	34b	14,55a	LBG96	0,42b	0,53b	0,04a	39b	10,66a
LBG52	0,58a	0,53b	0,11a	117a	16,25a	LMG31	0,42b	0,6b	0,04a	42a	10,79a
LBC80	0,57a	0,84a	0,07a	75a	14,47a	LMG9	0,42b	0,93a	0,08a	59a	11,75a
LBC85	0,57a	0,85a	0,06a	70a	14,23a	LMG28	0,41b	0,42b	0,04a	24b	7,45a
LMC24	0,56a	0,65b	0,06a	40b	16,23a	LMG32	0,41b	0,56b	0,04a	40b	11,37a
LBC66	0,56a	0,74a	0,06a	66a	12,94a	LMC17	0,41b	0,49b	0,04a	24b	10,53a
LBC75	0,55a	0,56b	0,06a	57a	12,7a	LBC63	0,41b	0,57b	0,05a	48a	9,56a
LBG86	0,54a	0,73a	0,06a	57a	12,13a	LMC18	0,41b	0,42b	0,05a	27b	7,06a
LMG6	0,54a	0,61b	0,03a	28b	11,99a	LBG100	0,40b	0,79a	0,08a	50a	10,4a
LBG55	0,54a	1,03a	0,03a	35b	10,89a	LMG14	0,4b	0,39b	0,04a	37b	10,04a
LBC88	0,54a	0,71a	0,07a	76a	13,04a	LBC64	0,38b	0,29b	0,03a	23b	22,96a
LBC87	0,53a	0,34b	0,07a	35b	13,27a	LMC3	0,38b	0,43b	0,04a	38b	10,71a
LMG5	0,53a	0,58b	0,05a	34b	10,98a	LMC8	0,375b	0,96a	0,05a	36b	8,06a
LMC21	0,53a	0,61b	0,06a	61a	14,68a	LBC58	0,36b	0,35b	0,07a	48a	10,33a
LBG92	0,53a	0,75a	0,06a	42b	14,08a	LMC15	0,36b	0,41b	0,05a	47a	7,43a
LMG29	0,53a	0,62b	0,04a	41b	12,21a	LMC39	0,34b	0,47b	0,02a	18b	8,47a

Tratamentos	MSPA	MSR	MSN	NN	N total	Tratamentos	MSPA	MSR	MSN	NN	N total
LMC12	0,52a	0,95a	0,07a	48a	13,49a	LMG33	0,34b	1,01a	0,03a	27b	10,92a
LMC38	0,52a	0,73a	0,07a	48a	14,49a	LMC16	0,33b	0,52b	0,05a	35b	9,18a
LBC56	0,51a	0,7a	0,07a	72a	11,85a	LBG97	0,32b	0,37b	0,05a	33b	7,3a
LMG35	0,51a	0,69a	0,08a	69a	13a	LBG82	0,30b	0,64b	0,05a	27b	6,14a
LMC23	0,5a	0,55b	0,03a	28b	13a	LMC1	0,29b	0,47b	0,02a	14b	7,93a
LMC26	0,5a	0,78a	0,08a	59a	13,38a	LMC40	0,26b	0,28b	0,04a	27b	7,78a
LMG2	0,5a	1,06a	0,09a	86a	31,56a						
Controles											
		BR3267	0,6225a	0,62b	0,07a	66a	14,47a				
		3299	0,5425a	1,13a	0,05a	50a	17,36a				
		TN	0,4275b	0,26b	0a	0c	9,58a				
		TEST	0,256667b	0,25b	0a	0c	5,85a				

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% (P<0,05). Metodologia 3: L-leguminosa/B:bebedouro/M:mandacaru/G:gorutuba/ C:caatingueiro.

MSPA(Massa seca da parte aérea) MSR(massa seca da raíz) MSN(massa seca de nódulos) NN(número de Nódulos) Ntotal(Nirogênio total da parte aérea)

5.5.2 – Capacidade de Promoção do Crescimento em Plantas de Milho.

Os resultados da produção de AIA, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e análise do ARDRA, permitiram a seleção de 80 isolados que mostraram potencial para promoção de crescimento em plantas de milho. No entanto, algumas bactérias causaram a morte de plantas, principalmente as provenientes da metodologia 1, restando apenas 69 isolados. Os tratamentos utilizados no presente estudo constaram de um controle absoluto (Controle ABS), duas estirpes referências, BR11417 (*Herbaspirillum seropedicae*) e BR 3299 (*Microvirga vignae*), e dois controles nitrogenados com 50% e 100% de N.

A tabela 12 mostra claramente uma tendência de incremento no desenvolvimento da planta pelo efeito positivo da inoculação dos isolados previamente selecionados, quando comparado com os controles. Entretanto, houve algumas diferenças de desempenho entre as bactérias oriundas das diferentes metodologias.

Para a MPAS, os isolados que se destacaram foram o DBG10 e PMG82, proporcionando um incremento médio superior à testemunha sem inoculação, ao tratamento com 50% da dose de N, ao tratamento que recebeu 100% da dose de nitrogênio e as referências em estudo. S isolados PBG56, PBG89, PMG5, PBG70, DBC19, DBG15, DBC1, DMC23, DBC24, DMC25, LBG82, LBC71, LMG31, LBC76, LMG27, LMG32, proporcionaram um incremento maior na MPAS, estatisticamente superior ao controle absoluto, as referências em estudo e ao tratamento com 50% de N. Os demais isolados não diferiram em relação a testemunha absoluta, demonstrando a baixa capacidade de promoção de crescimento destes isolados quando associados com a variedade em questão.

Já para a MSR, os tratamentos que apresentaram maior incremento não diferiram estatisticamente do controle absoluto, da BR 3299 e controle com 100% de N. O incremento no sistema radicular, que é determinado no início do desenvolvimento da planta, logo após o plantio, influencia o desenvolvimento da parte aérea e propicia, como no caso do milho, um aumento no número de fileiras de grãos por espiga. Essas vantagens iniciais podem ou não, repercutir na colheita, o que dependerá das condições posteriores de desenvolvimento da cultura (DIDONET et al. 2000).

Houve diferenças no acúmulo de N na parte aérea das plantas, sendo os tratamentos PBG82, PBG56, PBG89, PBG70, PMC20, PMG68, DBG10, DBG7, DBC19, DBG15, DBC1, DMC23, DBC24, DMC25, DBC20, LBG82, LBC71, LMG31, LBC76, LMG27, LMG32, LMC1, LMC8, LMG35, LBC89, LMG36, não diferiram do

tratamento com 100% de N e a estirpe BR11417. O fornecimento de N é muito importante para o crescimento das plantas, pois ele está envolvido em diversos processos fisiológicos, tais como fotossíntese, respiração, desenvolvimento e atividade das raízes, absorção iônica de outros nutrientes, diferenciação celular e genética (MARSCHNER, 2012; TAIZ e ZEIGER, 2013).

Embora o efeito da promoção de crescimento tenha aumentado com isolados da metodologia 1 e 2, os resultados também indicaram que a inoculação dos rizóbios (metodologia 3) proporcionou melhor aproveitamento do N aplicado, pois aumentou o acúmulo deste elemento e proporcionou maior eficiência na adubação. Fazendo-se necessário estudos onde a co-inoculação dos isolados que consiste na utilização de combinações de diferentes micro-organismos, no caso selecionar os melhores isolados das metodologias, aos quais produzem um efeito sinérgico, em que se superam os resultados produtivos obtidos com os mesmos, quando utilizados na forma isolada (FERLINI, 2006; BÁRBARO et al., 2008)

Deve-se considerar também que os isolados testados podem ter promovido o crescimento das plantas através da produção de fitormônios (AHEMAD e KIBRET, 2014; THAJUDDIN et al., 2015). De maneira geral os tratamentos DBG10 e PBG82 foram os que mais destacaram para os parâmetros de eficiência (MSPA, MSR e N total) o que demonstra a alta capacidade destes isolados em promoverem o crescimento da variedade de milho avaliado neste estudo e também apresentaram resultados positivos produção de AIA e solubilização de fosfato.

Vale salientar, que o DBG10, foi extraído das raízes e de uma área com adubação com N e o PBG82 do colmo e sem adubação nitrogenada, ambos provenientes de um solo argissolo vermelho –amarelo, susceptível a déficit hídrico e com baixos teores de matéria orgânica e nutrientes, características essas que podem conferir maior competitividade e adaptabilidade desses isolados, tornando-os promissores para a realização de estudos futuros em diferentes condições à campo no entanto. De acordo com os dados pode-se considerar o isolado DBG10 como um excelente candidato para testes de confirmação de eficiência a campo.

Novos estudos como este devem ser realizados em busca de novos isolados eficientes para uso na agricultura, tanto para o milho, como para outras gramíneas, tornando o modelo de agricultura atual mais sustentável.

Tabela 12. Promoção de crescimento de bactérias isoladas de milho no Semiárido, utilizando três metodologias diferentes.

Tratamento	Metodologia 1			Tratamento	Metodologia 2			Tratamento	Metodologia 3			
	MPAS	MRS	NTOTAL		MPAS	MRS	NTOTAL		MPAS	MRS	NTOTAL	
PBG82	8,8a*	2,4a	139,88a	DBG10	11,6a	3,45a	226,49a	LBG82	6,46b	1,76a	144,28a	
PBG56	6,67b	2,79a	144,43a	DBG7	7,22b	2,01a	143,65a	LBC71	5,91b	0,94b	91,39a	
PBG89	5,77b	2,32a	100,32a	DBC19	7,01b	2,00a	99,15a	LMG31	5,54b	1,55a	105,59a	
PMG5	5,65b	1,29b	128,19a	DMG29	5,79b	1,85a	114,97a	LBC76	5,48b	2,44a	109,75a	
PBG70	4,70b	1,5a	71,49b	DBG15	5,68b	1,92a	142,54a	LMG27	5,11b	2,19a	95,59a	
PMC20	3,99c	2,75a	85,9a	DBC1	5,6b	1,64a	98,21a	LMG32	4,41b	0,96b	97,2a	
PBC22	3,75c	1,32b	61,89b	DMC23	5,11b	1,72a	101,05a	LMC1	4,03c	1,37b	83,29a	
PBG90	3,74c	0,72b	63,57b	DBC24	5b	1,8a	93,84a	LMC8	3,83c	1,23b	112,65a	
PBC15	3,66c	1,94a	82,42b	DMC25	4,7b	2,35a	98,36a	LMG35	3,76c	2,19a	96,42a	
PMG68	3,60c	0,72b	73,96a	DBC14	4,16c	2,07a	52,93b	LBC89	3,76c	1,55a	85,87a	
PMC68	3,56c	1,32b	77,29b	DBM20	3,9c	2,93a	91,07a	LMG36	3,72c	0,65b	95,66a	
PBG80	3,54c	1,58a	54,69b	DMG26	3,28c	1,13b	64,83b	LBC13	3,48c	1,94b	61,78b	
PBC34	3,135c	1,37b	63,56b	DBC23	3,05c	1,16b	53,61b	LMG34	3,25c	1,58a	57,96b	
PMG61	2,71c	1,39b	49,01b	DMC18	2,91c	1,87a	48,15b	LMG7	3,205c	1,19b	46,41b	
PMC35	2,67c	0,85b	47,18b	DBC21	2,73c	1,66a	40,71b	LMG37	2,80c	1,32b	65,81b	
PBG81	2,66c	0,85b	51,67b	DMC45	2,6c	1,13b	55,93b	LMC17	2,71c	1,64a	48,08b	
PBG83	2,56c	1,05b	64,07b	DBC11	1,90c	0,98b	31,19b	LBG65	2,59c	1,92a	48,84b	
PBC42	2,41c	1,26b	52,74b	DBC6	1,77c	1,43a	29,24b	LMG8	2,58c	1,48a	49,44b	
PBC11	2,38c	0,98b	41,53b					LBC87	2,54c	0,62b	50,27b	
PBC44	2,27c	0,8b	31,99b					LMC12	2,06c	1,04b	39,54b	
PBG71	2,15c	1,01b	43,57b					LMG41	1,94c	1,83a	35,9b	
PBG88	2,11c	0,86b	37,98b					LBC78	1,87c	1,11b	29,73b	
PBC49	1,95c	1,21b	42,97b					LBC61	1,71c	1,22b	25,73b	
PBG79	1,7c	1,07b	24,03b					LBC67	1,55c	0,61b	31,7b	
PMC32	1,43c	0,25b	22,74b					LMG29	1,5c	0,74b	27,2b	
PMC65	1,35c	0,82b	30,96b									
*Médias seguidas pela mesma letra em um mesmo parâmetro não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. Comparação entre todas as médias (incluindo as 3 metodologias).				BR11417	3,23c	1,08b	89,78a					
				BR3299	2,84c	1,77a	52,2b					
				50N	2,83c	1,25b	49,04b					
				100N	5,82b	2,34a	122,72a					
				Controle ABS	3,16c	1,43a	48,27b					

Letras minúsculas compara entre isolados -Letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% (P<0,05). Metodologia 1: P-Placa Metodologia 2: Dobereiner (própos a metodologia de semissólido)Metodologia3: L-leguminosa/B:bebedouro/ M:mandacaru/ G:gorutuba/ C:caatingueiro.

6. CONCLUSÕES:

1 – Foi observada grande diversidade da comunidade bacteriana provenientes das duas áreas de coleta em milho com um total de 405 isolados;

2-O local de origem dos isolados foi fator determinante para o agrupamento das bactérias;

3- Um total de 92% dos isolados produziram AIA, 30% solubilizaram fosfato 19% sideróforos;

4- Os isolados PMC19 e o DBC1 apresentaram resposta positiva no testes de AIA, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e competitivos no teste de antagonismo indicando elevado potencial para produção de inoculantes;

5- Os isolados DBG10 e PBG82 proporcionam maiores benefícios às plantas quando inoculados nas sementes milho testadas em experimento de vasos, sendo mais eficiente com relação a FBN, para a cultivar de milho;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFOURTIT, J.; ZEHR, J.P.; PAERL, H.W. Distribution of nitrogen-fixing microorganisms along the Neuse river estuary, North Carolina. **Microbial Ecology**, v.41, p.114-123, 2001.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v.26, n.1, p.1- 20, 2014.

ALAM, S.; KHALIL, S.; AYUB, N.; RASHID, M. *In vitro* Solubilization of inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 4, n. 4, p. 454-458, 2002.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª Ed. Editora Artmed, 1463p, 2004.

ANDRADE, L.A.; PEREIRA, I.M.; LEITE, U.T.; BARBOSA, M.R.V. Análise da cobertura de duas fitofisionomias da caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. **Cerne**, v. 11, n.3, p. 253-262, 2005.

ANJUM, M. A.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; ASHRAF, M. Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. **Soil Environmental**, v. 30, n. 1, p. 18-26, 2011.

ARRUDA, L.; Beneduzi A.; Martins A.; Lisboa B.; Lopes C.; Bertolo F.; Vargas LK.; Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15- 22, 2013.

ARRUDA, L. M. Seleção e Caracterização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Milho Cultivadas no Rio Grande do Sul. 2012. **Dissertação** (65 Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul ,Porto Alegre, 2012.

ASSUMPCÃO, L. C.; LACAVALA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.5, p.503-510, 2009.

- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 11, p. 1559-70, 2010
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An Acad Bras Cienc**, v. 77, n. 3, p. 549-79, 2005.
- 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, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J.I, Reis V.M, Videira, S.S, BODDEY, L.H, BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil**, v.31,p. 348:413, 2014.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in FBN with non-legume plants. **Soil Biology e Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J.L.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOIS, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; CARVALHO, J.G. eds. **Inter-relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, p. 621-666, 1999.
- BALDANI, V.L.D.; OLIV EIRA, E.; BOLOTA, E.; BALDANI, J.L.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensissp. nov.*, uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. v. 69, p. 116. 1997.
- BASHAN, Y HOLGUIN, G AND DE BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**., 50: p 521- 577, 2004.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum-plant relationships envoiomental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal Microbiology**. v. 43, p. 103-121, 1997
- BASTIAN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7-11, 1998.

BÉCQUER, C. J. et al. Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 45, n. 4, 2011.

BENEDUZI A, MOREIRA F, COSTA PB, VARGAS LK, LISBOA BB, FAVRETO R, BALDANI JI, PASSAGLIA LMP Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the south of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p.94–104, 2013.

BENHAMOU, N.; GAGNE, S.; LE QUERE, D.; DEHBI, L. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 45-56, 2000.

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.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; BERGONCI, J. I.; BIANCHI, C. A. M.; MÜLLER, A. G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, p. 831-839, 2004.

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

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase-producing *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* SN10 promote rice growth, and in the process undergo colonization and chemotaxis. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 173-182, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Trigo**. Brasília - DF, 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>>. Acesso em: 8 fev. 2016.

CABALLERO-MELLADO, J. et al. *Burkholderia unamae* sp. nov. and N₂ fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MULLER, N. T. G.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento in vitro da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p 181-186, fev. 199

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumonia* in association with *Zea mays* L. **Applied Environment Microbiology**, v. 66, p. 783-787, 2000.

CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7271–7278. 2005.

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento, junho 2015 / **Companhia Nacional de Abastecimento**. – Brasília : Conab, 2015.

COSTA, E.M.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L.V.M.; MOREIRA, F.M.S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 48. p. 1275-1284. 2013.

COSTA, P.B.; GRANADA, C.E.; AMBROSINI, A.; MOREIRA, F.; SOUZA, R. ; PASSOS, J. F. M. ; ARRUDA, LETÍCIA ; PASSAGLIA, L.M.P. A Model to Explain Plant Growth Promotion Traits: A Multivariate Analysis of 2,211 Bacterial Isolates. **Plos One**, v. 9, p. e116020, 2014.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 274 283, 1999.

COSTA, E.M.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L.V.M.; MOREIRA, F.M.S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 48. p. 1275-1284. 2013.

COSTA, P.B.; GRANADA, C.E.; AMBROSINI, A.; MOREIRA, F.; SOUZA, R. ; PASSOS, J. F. M. ; ARRUDA, LETÍCIA ; PASSAGLIA, L.M.P. A Model to Explain Plant Growth Promotion Traits: A Multivariate Analysis of 2,211 Bacterial Isolates. **Plos One**, v. 9, p. e116020, 2014.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology e Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 274-283, 1999.

DEY, R.; PAL, K. K.; TILAK, K. V. B. R. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria. **The National Academy of Sciences, India, Sect. B Biol. Sci.**, v. 82, n. 3, p. 341-352, 2012. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2004, 41p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 117).

DIDONET, A.D., LIMA, O.S.; CANDATEN, A.A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Revista Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n. 2,p.401-411, 2000.

DIDONET, C.C.G.M. Bactérias diazotróficas: isolamento, diversidade e caracterização em plantas do arroz no cerrado. Anápolis: **UNU CET**, 20 p, 2007.

DIMKPA, C., MERTEN, D., SVATOS, A., BUCHEL, G., KOTHE,E. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. **Soil Biol & Biochem**,v.41, p.154-162,2009.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews Microbiology**. v.2, p.621-631, 2004.

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., RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de Beijerinckia. **Revista de Biologia** v.1, p.261- 272, 1958.

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

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen-fixing sites. **First international symposium on nitrogen fixation**, p.518-538, 1976.

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.

EHRENFELD, J. G.; RAVIT, B.; ELGERSMA, K. Feedback in the plant-soil system. **Annual Review of Environment and Resources.**, v.30,p.75-115, 2005

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**, v.67, p.2790-2798, 2001.

ESTRADA, G.; BALDANI, V.L.D; OLIVEIRA,D.M; URQUIAGA, S; BALDANI, J.I Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic Herbaspirillum and Burkholderia strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, n.1-2, p. 115-129, 2013.

estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M.V.B.et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais.**

extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**,v.6, n.2, p.35-38, 2004.

FAN, B. CHEN XH, BUDI HARJO A, BLEISS W, VATER J, BORRIS R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 4, p. 303-311, 2011.

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

FANKEM, H. NGO KNOT, L.; DEUBEL, A.; QUINN, J.; MERBACH, W.; ETOA, F.X. E NWAGA, D.- Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated acidic soils of Camerron. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 2, n. 7, p. 171-178,2008.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a Amplificação Simultânea de Fragmentos dos Genes nifH e nodC em Bactérias Isoladas de Nódulos de Leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, Comunicado técnico: 158, 6 p. 2013

FERNANDES JÚNIOR, P.I.; PEREIRA, G.M.D.; PERIN, L.; SILVA, L.M.; BARAÚNA, A.C.; ALVES, F. M.; PASSOS, S.R.; ZILLI, J.É. Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista de Biología Tropical**, v. 61, p. 991-999, 2013.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Bactérias promotoras do crescimento de plantas:

FORNASIERI, Filho. D. Manual da cultura do milho. Jaboticabal, **Funep**,p,576.2007.

FRY, S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, v. 75, p. 532–536, 1989.

GOLDBERG, R. Cell wall polysaccharidase activities and growth processes: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**,v. 50, p. 261–264, 1980.

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 **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF. p. 310-350, , 2000

GROVER M, ALI SKZ, SANDHYA V, RASUL A, VENKATESWARLU B Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1231-1240, 2011.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; ROMERO, E. M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 117-126, 2001.

Hameed, S.; YASMIN, S.; MALIK, K.A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 39, p.179, 2004.

HARSH, P.B.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.233-266, 2006.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, n.1-2, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: **Embrapa Soja**, 36p, 2011. (Documentos 325).

HUNGRIA, M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biology e Biochemistry**,v.32, p.627- 637, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**. v. 331, p. 413-425, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamentosistemático da produção agrícola, Sistema IBGE e recuperação automática – SIDRA**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 03

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

KOOMNOK, C.; TEAUMROONG, N.; RERKASEM, B.; LUMYONG, S. Diazotrophendophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. **Science Asia**, v.33, p.429-435, 2007.

KUMAR, P. R.; RAM, M. R. Production of indole acetic acid by Rhizobium isolates from *Vigna trilobata* (L) Verdc. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 27, p. 5536-5541, 2012.

KUMAR, P.; DUBEY, R.C. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v.167, p.493-499, 2012.

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

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragments length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.58-63, 1994.

LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F.; LEMANCEAU, P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2449-2456, 1996.

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

LIU, F. C. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4617-4625, 2013.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. van der. Endophytic bacteria and their

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 183, p. 265-275, 1951.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, 2012

- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. van der. Endophytic bacteria and their
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 183, p. 265-275, 1951.
- MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p
- MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, 2012
- MATOS, M. J. L. F.; TAVARES, S. A.; SANTOS, F. F. DOS; MELO, M. F. DE; LANA, M. M. **Milho verde**. 2006. Disponível em: 105 <http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos_colheita/dicas/pagina_milho_verde.html>. Acessado em: 02 de Julho de 2015
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITZ, G. Isolation and identification of Gluconacetobacter azotocaptans from corn rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.496–501, 2006.
- MISHRA, R. P. N. et al. Rhizobium-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in Rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v. 52, p. 383-389, 2006.
- MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.
- MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** V. 1; P.74-99; 2010.
- MOTHAPO, N.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch genotypes, **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 201-213, 2013.
- MWAJITA, M.R. MURAGE, H.; TANI, A.; KAHANGI, E.M. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. **SpringerPlus**, v. 2, p. 606, 2013.

NAIK, P. R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 230, 2008.

NOGUEIRA, C.A.M.; MOMESSO, C.A.S.; MACHADO, R.L.D.; ALMEIDA, M.T.G. de; ROSSIT, A.R.B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Jaguariúna: (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), p.40, 2003.

OLIVEIRA, F.A. et al. Crescimento do milho adubado com nitrogênio e fósforo em um Latossolo Amarelo. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.4, p.238-244, 2009.

OSÓRIO FILHO, B. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 126 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays L.*)**. 2009. 74f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2158-2163. 2008

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2158-2163. 2008.

PENROSE, D.M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 10-15, 2003.

MWAJITA, M.R. MURAGE, H.; TANI, A.; KAHANGI, E.M. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. **SpringerPlus**, v. 2, p. 606, 2013.

NAIK, P. R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 230, 2008.

NOGUEIRA, C.A.M.; MOMESSO, C.A.S.; MACHADO, R.L.D.; ALMEIDA, M.T.G. de; ROSSIT, A.R.B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Jaguariúna: (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), p.40, 2003.

OLIVEIRA, F.A. et al. Crescimento do milho adubado com nitrogênio e fósforo em um Latossolo Amarelo. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.4, p.238-244, 2009.

OSÓRIO FILHO, B. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 126 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays L.*)**. 2009. 74f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2158-2163. 2008

PENG, G.; YUAN, Q.; LI, H.; ZHANG, W.; TAN, Z. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2158-2163. 2008.

PENROSE, D.M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 10-15, 2003.

PENROSE, D.M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 10-15, 2003.

- POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F.; MONROZIER, L.J. Comparison of nifH gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.2255-2262, 2001.
- 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.
- RAVEN, H.P.; EVERT, F.R.; EICHHORN E.S. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. p. 698-719, 2001.
- REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion*
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. **Life in grasses: diazotrophic endophytes**. *Trends in Microbiology*, Marburg, v.6, n.4, p.139-144, 1998.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.
- REIS JUNIOR, F.B. dos; SILVA, M.F. da; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Intra-specific diversity study of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria* species. **Symbiosis**, v.36, p.41-56, 2004.
- REIS, V. M. ; ALVES, G.C.; MARRIEL, I.E.; REIS JUNIOR, F.B.; ZILLI, J.E. **Recomendação do inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR 11417**. Seropedica: Embrapa Agrobiologia, 2009 (Comunicado Técnico).
- REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M. de; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: 45 FERNANDES, M. S. (Ed.). *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo . p. 153- 174, 2006.
- Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific
- RODRÍGUEZ BLANCO A., SICARDI, M., Frioni L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*zea mays* l). **Biology and Fertility of Soils**, v.51, p.391-402, 2015.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4/5, p. 319, 1999.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M. ; KENT, A. D. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J.**, 1: p. 283-290,2007

ROESCH, L.F.; CAMARGO, F.; SELBACH, P.; SÁ, E.S. de; PASSAGLIA, L. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.924-927, 2005.

ROSADO A. DUARTE, G.F, SELDIN L e VAN ELSAS JD .Genetic diversity of nifH gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p. 2770-2779, 1998.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 181, p. 337-344, 2004.

ROUWS, L.F.M.; LEITE, J.; MATOS, G.F.; ZILLI, J.E.; COELHO, M.R.R.; XAVIER, G.R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, p. 354-363, 2014.

SCHLOTTER, M. et al. Root colonization of different plants by plant growthpromotin

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 4, p. 239-249, 2004.

SHAHZAD, S. et al. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 27-34, 2013.

SHALI, A.; GHASEMI, S.; AHMADIAN, G.; RANJBAR, G., DEHESTANI, A.; KHALES, N.; MOTALLEBI, E.; VAHED, M. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. **Phytoparasitica**, v.38, p.141-147, 2010.

SILVA, DÉBORAH E. S. G.; OLIVEIRA, LUCIANA G. Avaliação da produção de sideróforos em actinomicetos. **XIX Congresso Interno de Iniciação Científica UNICAMP**, 2011.

SILVA, K.; PERIN, L.; GOMES, M. L. ; BARAUNA, A. C. ; PEREIRA, G. M. D. ; ZILLI, J. E. Caracterização genotípica de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de milho cultivado em Roraima. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Uberlândia. **Anais XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. Uberlândia, 2011. p. 1-3.

SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, A. F.; ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 163-171, 2013.

SILVA, M.F.; OLIVEIRA, P.J; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; REIS, V.M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1437-1443, 2009.

SILVA, P. C. G.; MOURA, M. S. B.; KIILL, L. H. P.; BRITO, L. T. L.; PEREIRA, L. A.; SA, I. B.; CORREIA, R. C.; TEIXEIRA, A. H. de C.; CUNHA, T. J. F.; GUIMARÃES FILHO, C. **Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos**. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. (Ed.). *Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação*. Petrolina: Embrapa Semiárido, cap. 1, p. 18-48, 2010

SIMONETTI, E.; CARMONA, M.A.; SCANDIANI, M.M.; GARCÍA, A.F.; LUQUE, A.G.; CORREA, O.S.; BALESTRASSE, K.B. Evaluation of indigenous bacterial strains for biocontrol of the frog-eye leaf spot of soya bean caused by *Cercospora sojina*. **Letters in Applied Microbiology**, v.55, p.170–173, 2012.

SINGH, R.K.; MISHRA, R.P.; JAISWAL, H.K.; KUMAR, V.; PANDEY, S.P.; RAO, S.B.; ANNAPURNA, K. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, v. 52, p. 345–349. 2006.

SHALI, A.; GHASEMI, S.; AHMADIAN, G.; RANJBAR, G., DEHESTANI, A.; KHALESÍ, N.; MOTALLEBI, E.; VAHED, M. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana*. **Phytoparasitica**, v.38, p.141-147, 2010.

SILVA, DÉBORAH E. S. G.; OLIVEIRA, LUCIANA G. Avaliação da produção de sideróforos em actinomicetos. **XIX Congresso Interno de Iniciação Científica UNICAMP**, 2011.

SILVA, K.; PERIN, L.; GOMES, M. L. ; BARAUNA, A. C. ; PEREIRA, G. M. D. ; ZILLI, J. E. Caracterização genotípica de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de milho cultivado em Roraima. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Uberlândia. **Anais XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. Uberlândia, 2011. p. 1-3.

SILVA, M. C. P.; FIGUEIREDO, A. F.; ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 163-171, 2013.

SILVA, M.F.; OLIVEIRA, P.J; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; REIS, V.M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1437-1443, 2009.

SILVA, P. C. G.; MOURA, M. S. B.; KIILL, L. H. P.; BRITO, L. T. L.; PEREIRA, L. A.; SA, I. B.; CORREIA, R. C.; TEIXEIRA, A. H. de C.; CUNHA, T. J. F.; GUIMARÃES FILHO, C. **Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos**. In: SÁ, I. B.; SILVA, P. C. G. (Ed.). *Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação*. Petrolina: Embrapa Semiárido, cap. 1, p. 18-48, 2010

SIMONETTI, E.; CARMONA, M.A.; SCANDIANI, M.M.; GARCÍA, A.F.; LUQUE, A.G.; CORREA, O.S.; BALESTRASSE, K.B. Evaluation of indigenous bacterial strains for biocontrol of the frog-eye leaf spot of soya bean caused by *Cercospora sojina*. **Letters in Applied Microbiology**, v.55, p.170–173, 2012.

SINGH, R.K.; MISHRA, R.P.; JAISWAL, H.K.; KUMAR, V.; PANDEY, S.P.; RAO, S.B.; ANNAPURNA, K. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, v. 52, p. 345–349. 2006.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUZA, R. ; AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; COSTA, P.B.; MEYER, J.; VARGAS, L.K.; SCHOENFELD, R.; PASSAGLIA, L.M.P. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, v. 360, p. 1-19, 2013.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

STROSCHEIN, M. R. D. et al. Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1738-1743, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, ArtMed, 5 ed , 954p, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 3. ed. Sunderland: **Sinauer Associates**, p.690, 2002.

TEIXEIRA, K. R. dos S. **Isolamento e caracterização do operon *glnAntr* *Herbaspirillum seropedicae* Z78**. 1991. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

THAJUDDIN, N.; MURALITHARAN, G.; DHANASEKARAN, D.; MUHAMMAD, I.M.H. Microbial symbionts of plants. **Plant biology and biotechnology: Plant diversity, organization, function and improvement**, p. 281-306, 2015.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, 19– 28, 1991.

TILAK, K.V.B.R.; SINGH, C.S.; ROY, N.K.; SUBA RAO, N.S. *Azospirillum brasiliense* and *Azotobacter chroococcum* inoculum: effect on yield of maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, n.4, p.417-418, 1981.

TURNBULL, A. L.; LIU, Y.; LAZAROVITS, G. Isolation of bacteria from the rhizosphere and rhizoplane of potato (*Solanum tuberosum*), grown in two distinct soils using semi selective media and characterization of their biological properties. **American Journal of Potato Research**, v. 89, p. 294- 305, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE -USDA (2014). Acesso em: 15 de abril 2015.

VAN LOON, L. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, v. 119, n. 3, p. 243-254, 2007

VARGAS, L. et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; VEZYRI, E.; KEFALOGIANNI, I.; ARGYRIS, N.; LIARA, G.; PERGALIS, P.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P. Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from field-grown barley, oat and wheat. **The Journal of Microbiology**, v.49, p.525-534, 2011.

VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VIDEIRA, S. S. **Taxonomia Polifásica de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Sphingomonas spp.* e Efeito da Inoculação em Plantas de Arroz.** 2008. 140f. Trabalho de Pós Graduação (Pós Graduação em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2008.

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

WELBAUM, G.E.; STURZ, A.V.; DONG, Z.; NOWAK, J.; Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Review in Plant Science**,v. 23, n. 2, p. 175-193, 2004.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 386-392, 1998.

YANNI, Y. G; DAZZO, F. B. Enhancement of rice production using endophytic strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in extensive field inoculation trials within the Egypt Nile delta. **Plant Soil**, v. 336, p. 129-142, 2010

ZEHR, J.P., JENKINS, B.D., SHORT, S.M. **Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison.** *Environmental Microbiology*,v. 5, p. 539–554, 2003.

ZEHR, J.P.; BRAUN, S., CHEN, Y., MELLON, M. Nitrogen fixation in the marine environment: relating genetic potencial to nitrogenase activity. **J Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.203, p.61-73, 1996.

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

8.ANEXOS

Anexo 1:

Tabela 2: Caracterização Morfológica de isolados obtidos da Metodologia 1

Características dos grupos/ Campo Experimental Bebedouro-PE									Características dos grupos/ Campo Experimental Mandacaru-BA								
Grupos/ Nº de isolados	TC	FC	AC	TR	CC	E	PM	QM	Grupos/ Nº de isolados	TC	FC	AC	TR	CC	E	PM	QM
Grupo 1 (1)	<1	C	H	O	Am	N	N	N	Grupo 1 (2)	1-2	C	H	O	Am	S	S	M
Grupo 2 (1)	1-2	C	H	O	Am	S	S	P	Grupo 2 (2)	1-2	C	H	T	Am	S	S	M
Grupo 3 (1)	1-2	C	H	O	Cr	N	N	N	Grupo 3 (1)	1-2	C	H	T	Am	S	N	N
Grupo 4 (1)	<1	C	H	T	Ver	N	S	M	Grupo 4 (1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 5 (1)	1-2	C	H	T	Lar	S	S	P	Grupo 5 (1)	1-2	I	Het	T	Am	S	N	N
Grupo 6 (1)	<1	C	H	O	Cr	N	N	N	Grupo 6 (2)	1-2	I	H	T	Am	S	S	P
Grupo 7 (1)	<1	C	H	T	Cr	N	N	N	Grupo 7 (1)	1-2	C	H	O	Cr	N	S	M
Grupo 8(4)	<1	C	H	T	Am	S	S	P	Grupo 8(1)	<1	C	H	T	Cr	S	S	P
Grupo 9 (1)	>2	C	Het	O	Cr	S	N	N	Grupo 9 (1)	>2	I	H	O	Cr	S	S	P
Grupo 10 (1)	<1	C	H	T	Cr	N	S	M	Grupo 10 (1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 11 (1)	<1	C	H	T	Lar	S	S	P	Grupo 11 (2)	1-2	I	H	O	Am	N	S	P
Grupo 12 (1)	<1	C	H	T	Br	N	S	M	Grupo 12 (1)	1-2	I	H	O	Cr	S	S	M
Grupo 13 (1)	<1	C	H	O	Cr	N	N	N	Grupo 13 (3)	1-2	C	H	O	Cr	S	S	P
Grupo 14 (1)	<1	C	H	T	Am	N	S	P	Grupo 14 (1)	>2	C	H	T	Am	S	S	P
Grupo 15(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N	Grupo 15(1)	<1	C	H	O	Verde	S	S	P
Grupo16 (1)	1-2	C	H	T	Am	S	S	M	Grupo16 (1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 17(1)	<1	C	H	T	Cr	S	S	P	Grupo 17(1)	>2	C	H	T	Cr	S	S	M
Grupo 18(3)	<1	C	H	T	Cr	N	S	P	Grupo 18(7)	<1	C	H	T	Am	N	S	P
Grupo 19(1)	1-2	C	H	O	Cr	N	S	P	Grupo 19(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 20 (1)	<1	I	H	T	Cr	N	N	N	Grupo 20 (1)	1-2	C	H	T	Cr	S	N	N
Grupo 21(1)	<1	C	H	T	R	N	S	P	Grupo 21(7)	<1	I	H	T	Am	S	S	P
Grupo 22(1)	1-2	C	H	O	Am	N	N	N	Grupo 22(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	S	P
Grupo 23(1)	>2	C	H	T	Am	N	S	M	Grupo 23(1)	1-2	C	H	O	Am	N	S	P
Grupo 24(1)	1-2	C	Het	T	Am	N	N	N	Grupo 24(3)	1-2	C	H	T	Am	S	S	P

Grupo 25(6)	1-2	C	H	T	Am	N	S	P	Grupo 25(1)	1-2	C	H	T	Am	N	S	P
Grupo 26(1)	1-2	C	H	T	Am	N	S	M	Grupo 26(4)	1-2	C	H	T	Am	N	S	P
Grupo 27(2)	1-2	C	H	T	Cr	N	S	M	Grupo 27(6)	1-2	C	H	T	Cr	N	S	P
Grupo 28(1)	>2	C	H	T	Cr	N	N	N	Grupo 28(1)	1-2	C	H	O	Am	S	S	P
Grupo 29(2)	1-2	C	H	T	Am	N	N	N	Grupo 29(10)	1-2	C	H	T	Am	S	S	P
Grupo 30(2)	1-2	C	H	T	Am	N	N	N	Grupo 30(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 31(1)	1-2	C	H	T	Ver	N	N	N	Grupo 31(1)	1-2	C	H	O	Cr	N	S	P
Grupo 32(2)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N	Grupo 32(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 33(5)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N	Grupo 33(2)	1-2	I	H	O	Cr	N	S	P
Grupo 34(1)	1-2	C	H	O	Lar	N	N	N	Grupo 34(5)	1-2	I	H	O	Cr	N	S	P
Grupo 35(1)	>2	C	H	O	Cr	S	S	M	Grupo 35(1)	1-2	C	H	T	R	S	N	N
Grupo 36(1)	1-2	C	H	T	Cr	S	S	M	Grupo 36(3)	1-2	I	H	T	Am	S	S	M
Grupo 37(1)	<1	C	H	T	Lar	N	N	N	Grupo 37(1)	1-2	C	H	O	Cr	N	N	N
Grupo 38(1)	1-2	C	H	O	Am	N	S	P	Grupo 38(4)	1-2	C	H	T	Cr	S	S	P
Grupo 39(1)	1-2	C	H	O	R	N	N	N	Grupo 39(2)	<1	C	H	T	Am	N	N	N
Grupo 40(1)	1-2	C	H	O	Cr	N	S	P	Grupo 40(1)	1-2	I	H	T	Am	N	N	N
Grupo 41(1)	1-2	C	H	T	Lar	N	S	P	Grupo 41(1)	1-2	C	H	T	Am	N	N	N
Grupo 42(2)	>2	C	H	T	Lar	S	S	P	Grupo 42(9)	1-2	C	H	T	Am	S	S	M
Grupo 43(4)	1-2	C	H	T	Cr	N	S	P	Grupo 43(1)	<1	I	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 44(7)	1-2	C	H	T	Cr	S	S	P	Grupo 44(2)	<1	C	H	T	R	N	N	N
Grupo 45(1)	<1	I	H	T	Cr	N	S	P	Grupo 45(8)	<1	C	H	O	Am	N	N	N
Grupo 46(3)	1-2	C	H	T	Am	N	S	P	Grupo 46(5)	>2	C	H	T	L	S	S	M
Grupo 47(1)	>2	C	H	T	Cr	S	S	M	Grupo 47(1)	1-2	I	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 48(4)	1-2	C	H	T	Am	N	S	P	Grupo 48(1)	<1	I	Het	O	R	N	N	N
Grupo 49(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	S	P	Grupo 49(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 50(1)	>2	C	H	T	Cr	N	S	M	Grupo 50(3)	1-2	I	H	O	Cr	N	N	N
Grupo 51(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	S	P	Grupo 51(1)	<1	C	H	T	Cr	S	N	N
Grupo 52(1)	1-2	C	H	O	Am	S	S	M	Grupo 52(1)	1-2	I	H	O	Cr	N	S	M
Grupo 53(1)	1-2	C	H	T	Ver	N	S	P	Grupo 53(1)	1-2	C	H	T	Cr	N	N	N

Grupo 54(2)	1-2	C	H	O	Cr	S	S	P
Grupo 55(1)	<1	C	H	T	Ver	N	N	N
Grupo 56(2)	1-2	C	H	T	Lar	S	S	M
Grupo 57(1)	1-2	C	H	T	Ver	N	S	M
Grupo 58(2)	1-2	C	H	T	Ver	N	S	P
Grupo 59(1)	<1	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 60(1)	>2	C	Het	T	Ver	S	S	P

Grupo 54(1)	<1	C	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 55(1)	<1	C	Het	O	B	S	S	P
Grupo 56(1)	<1	C	H	T	Cr	N	S	P
Grupo 57(1)	1-2	I	H	T	Cr	N	N	N
Grupo 58(1)	1-2	C	H	T	L	S	S	P
Grupo 59(2)	1-2	I	Het	O	Verm	N	N	N
Grupo 60(2)	<1	I	Het	O	Am	N	N	N

Anexo 3:

Características dos grupos/ Campo Experimental Bebedouro-PE												Características dos grupos/ Campo Experimental Mandacaru-BA											
Grupos/Nº de isolados	TC	pH	DC	FC	AC	TR	CC	EC	PM	QM	TM	Grupos/ Nº de isolados	TC	pH	DC	FC	AC	TR	CC	EC	PM	QM	TM
Grupo 1 (1)	R	Al	>2	C	Het	O	azul	S	S	P	V	Grupo 1 (1)	R	Ac	>2	I	Hom	T	Am	S	S	M	V
Grupo 2 (1)	L	Al	>2	C	Het	T	Cr	S	S	P	V	Grupo 2 (1)	R	Al	<1	I	Het	T	Azul	S	S	M	V
Grupo 3 (1)	L	Al	1-2	I	Hom	T	Cr	S	S	M	F	Grupo 3 (1)	L	Al	>2	C	Hom	T	Cr	S	S	M	V
Grupo 4 (1)	L	Al	1-2	I	Hom	T	Cr	S	S	M	V	Grupo 4 (1)	L	Al	1-2	C	Hom	T	Cr	S	S	M	F
Grupo 5 (1)	R	Al	<1	C	Hom	T	Cr	S	S	M	F	Grupo 5 (1)	R	Al	>2	I	Het	T	Cr	S	S	M	F
Grupo 6 (1)	R	Al	>2	C	Hom	O	Am	S	S	M	V	Grupo 6 (1)	L	Al	<1	I	Het	T	Cr	S	S	P	F
Grupo 7 (1)	R	Al	<1	C	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 7 (1)	R	Al	1-2	I	Hom	T	Azul	S	S	M	V
Grupo 8(1)	R	Al	1-2	I	Het	O	Am	S	S	M	V	Grupo 8(1)	L	Al	>2	C	Het	T	Cr	S	S	M	F
Grupo 9 (1)	L	Al	<1	C	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 9 (1)	R	Al	>2	C	Hom	T	Cr	S	S	M	V
Grupo 10 (1)	R	Al	<1	C	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 10 (3)	R	Al	<1	I	Het	T	Cr	S	S	M	V
Grupo 11 (1)	R	Al	<1	C	Hom	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 11 (1)	R	Al	1-2	C	Hom	T	Cr	S	S	M	V
Grupo 12 (1)	R	Al	<1	C	Hom	T	Am	S	S	M	F	Grupo 12 (1)	R	Al	1-2	C	Het	T	Cr	S	S	M	V
Grupo 13 (2)	R	Al	<1	C	Hom	O	Cr	S	S	P	V	Grupo 13 (1)	R	Al	>2	C	Het	T	Cr	S	S	M	V
Grupo 14 (1)	R	Al	<1	C	Het	O	Cr	S	S	M	F	Grupo 14 (1)	R	Al	>2	I	Hom	T	Cr	S	S	M	V
Grupo 15(1)	R	Al	<1	I	Het	T	Cr	S	S	M	V	Grupo 15(1)	R	Al	>2	I	Het	T	Cr	S	S	M	V
Grupo16(1)	R	Al	>2	C	Het	T	Am	S	S	M	V	Grupo16(1)	R	Al	>2	I	Het	T	Azul	S	S	M	V
Grupo 17(1)	R	Al	1-2	I	Hom	T	Cr	S	S	M	V	Grupo 17(1)	R	Al	<1	I	Het	T	Azul	S	S	M	V
Grupo 18(1)	R	Al	>2	I	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 18(1)	R	Al	<1	I	Hom	T	Cr	S	S	M	F
Grupo 19(1)	R	Al	<1	I	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 19(1)	L	Al	<1	C	Hom	T	Cr	S	S	M	F
Grupo 20 (1)	L	Al	1-2	C	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 20 (1)	R	Al	<1	C	Hom	T	Azul	S	S	M	F
Grupo 21(1)	L	Al	<1	C	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 21(1)	L	Al	1-2	I	Het	T	Azul	S	S	M	F
Grupo 22(2)	L	Al	>2	I	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 22(1)	L	Al	1-2	I	Het	T	Cr	S	S	M	F
Grupo 23(2)	L	Al	>2	C	Het	O	Cr	S	S	M	V	Grupo 23(2)	L	Al	>2	I	Hom	T	Cr	S	S	M	F
Grupo 24(1)	L	Ac	1-2	I	Hom	T	Am	S	S	P	V	Grupo 24(3)	L	Al	1-2	I	Hom	O	Cr	S	S	M	V

