

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

**Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu
potencial biotecnológico**

Laura de Castro Assumpção

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

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Laura de Castro Assumpção
Bióloga

Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN**

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

Piracicaba
2008

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

Assumpção, Laura de Castro

Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico / Laura de Castro Assumpção. - - Piracicaba, 2008.
93 p. : il.

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

1. Bactérias - Técnicas moleculares 2. Biotecnologia 3. Enterobacter 4. Fixação de nitrogênio 5. Fosfatos 6. Microrganismos endofíticos 7. Sementes 8.. Soja I. Título

CDD 633.34
A851d

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

DEDICO

À MINHA FAMÍLIA

OFEREÇO

A TODOS OS MEUS MESTRES, DESDE A INFÂNCIA ATÉ OS DIAS DE HOJE

AGRADECIMENTOS

- Agradeço o meu orientador, **Prof. Dr. José Otávio Machado Menten**, pela oportunidade, confiança e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.
- Ao **Dr. Paulo Teixeira Lacava** pela fundamental co-orientação, paciência e dedicação durante todo o desenvolvimento do projeto.
- Ao **Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo** pelo carinho, incentivo e apoio de sempre.
- À **Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner** pela receptividade, gentileza e pelas facilidades concedidas no Laboratório de Genética de Microrganismos-ESALQ-USP.
- Ao **Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo** pela colaboração e agradável convivência no Laboratório de Genética de Microrganismos ESALQ-USP.
- À **Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes (Helô)** pela paciência, colaboração em diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho e por ceder os isolados de fungos utilizados.
- Ao **Prof. Dr. Isaias O. Geraldi** pela cooperação no desenvolvimento dos experimentos de casa de vegetação.
- À **Monsanto do Brasil LTDA**, em especial à **Natalie Andreoli** por conceder as sementes de soja utilizadas nos experimentos.
- Aos meus pais, **Nelson Assumpção Filho** e **Fátima C. C. Assumpção**, irmãos **Nelson Assumpção Neto** e **Daniel C. Assumpção** e cunhada **Renata F. P. Cordeiro Assumpção**, pelo apoio incondicional, amor, educação e por serem meus exemplos de vida.
- Ao meu noivo, **Guilherme Lacava de Moura**, pelo amor, paciência e apoio nas minhas decisões; e à sua família por sempre me receber de braços abertos, tão carinhosamente.
- Às grandes amigas feitas em Piracicaba, que levarei no coração para onde for, em especial às “codornas” **Cristiane Cipola Fasanella (Kit)**, **Júlia Ronzela Ottoni** e **Lílian Luzia Beloti**. Obrigada pela companhia e pelas risadas durante esses dois excelentes anos!

- Aos **amigos do Laboratório de Patologia de Sementes** do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ-USP, Alderí Emídio Araújo, Alessandra A. Rabalho; Annelise Tremocoldi; Diogo A. Togni, Guilherme Moro, Luana Botelho, Pastora J. Querales, Paulo H. Bertucci Ramos, Thaïs Dias Martins, Tathiana Lisboa-Padulla e Vanessa C. Frare, pelas construtivas “discussões de corredor”, ajudas e carinho.
- Aos **colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos** do Departamento de Genética da ESALQ-USP, Aline S. Romão, Ana Paula Pallu, Anderson Ferreira, Andrea Bogas, Emiliana Manesco Romagnoli, Fernanda Sebastianes, Fernanda Bernardes, José Antônio da Silva (Zézo), Léa C. Fávoro, Manuella Dourado, Marcus Venicius Lourenço (Polé), Maria Beatriz C. Rodrigues, Maria Carolina Quecine, Mariele Porto Carneiro Leão, Marise Suzuki, Michele Silva, Priscilla Rossetto, Renata Assis, Rodrigo Mendes, Uira C. Belmonte e Viviane Colombari pelas dicas, ajudas e agradável convivência.
- Em especial aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos **Danice Mazzer Luvizotto (Metal)**, **Joelma Marcon** e **Armando Cavalcante Franco Dias**, companheiros de todos os dias, pelas risadas e ajuda fundamental no meu trabalho.
- À **Aricelis Biscáro Mela (Lili)** pelo apoio no planejamento e execução dos experimentos, pela amizade e pela alegre convivência.
- Ao **Carlos Ivan Aguilar-Vildoso (Carlão)** pela amizade, críticas construtivas e apoio técnico durante os experimentos de casa de vegetação e análise estatística.
- Ao **Francisco Dini Andreote** pela valiosa ajuda na discussão do trabalho.
- Ao **Dr. Fernando Dini Andreote** pela disposição de sempre em ajudar e pelas dicas na conclusão a dissertação.
- À querida amiga **Carla Beraldo** pelas correções da dissertação.
- Aos **funcionários** dos Departamentos de Genética e de Fitopatologia, com quem tive uma alegre convivência.
- - A todos os **colegas do PPG Microbiologia Agrícola** da ESALQ-USP e à **Giovana**, secretária do programa de pós graduação, por toda a ajuda fundamental.

- À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro.
- A **todos** aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito Obrigada

"A CIÊNCIA SE COMPÕE DE ERROS QUE, POR SUA VEZ, SÃO OS PASSOS ATÉ A VERDADE."

(JULIO VERNE)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 DESENVOLVIMENTO.....	23
2.1 Revisão Bibliográfica.....	23
2.1.1 A cultura da soja	23
2.1.2 Sementes.....	24
2.1.3 Comunidade bacteriana endofítica associada às plantas.....	26
2.1.4 Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas.....	28
2.1.5 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos.....	29
2.1.5.1 Controle biológico.....	29
2.1.5.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	31
2.1.5.3 Bactérias produtoras de ácido-indol-acético (AIA).....	32
2.1.5.4 Solubilização de fosfato inorgânico.....	33
2.1.6 Influência da transgenia na comunidade bacteriana endofítica.....	33
2.1.7 Análise do gene 16S rDNA para estudos de diversidade em comunidades bacterianas	34
2.1.8 Tratamento biológico de sementes.....	35
2.2 Material e métodos.....	36
2.2.1 Material vegetal.....	36
2.2.2 Isolamentos de bactérias endofíticas de sementes de soja.....	37
2.2.2.1 Isolamentos por trituração.....	37
2.2.2.2 Isolamento por separação de cotilédones (fragmentação).....	38
2.2.3 Estoque e seleção de isolados para ARDRA.....	38
2.2.4 PCR do gene 16S rDNA.....	39
2.2.5 Clivagem do gene 16S rDNA (ARDRA).....	39
2.2.6 Identificação dos isolados bacterianos por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.....	40

2.2.7	Análise das sequências 16S rDNA.....	40
2.2.8	Análise funcional das bactérias isoladas das sementes de soja.....	41
2.2.8.1	Ensaio de antagonismo contra fungos fitopatogênicos (método da cultura pareada).	41
2.2.8.2	Ensaio de produção de AIA (Ácido-Indol-Acético).....	43
2.2.8.3	Ensaio de solubilização de fosfato inorgânico.....	44
2.2.8.4	Ensaio de fixação biológico de nitrogênio (FBN).....	44
2.2.8.5	Ensaio de promoção de crescimento por inoculação de bactérias endofíticas em sementes de soja.....	44
2.2.9	Análise estatística.....	46
2.3	Resultados e discussão.....	46
2.3.1	Isolamento de bactérias endofíticas de sementes de soja.....	46
2.3.2	Origem dos isolados identificados.....	50
2.3.3	ARDRA, sequenciamento parcial da região 16S rDNA e classificação filogenética dos isolados bacterianos.....	51
2.3.4	Análise de diversidade e rarefação.....	56
2.3.5	Análises funcionais das bactérias isoladas de sementes de soja.....	59
2.3.6	Ensaio de antagonismo.....	59
2.3.7	Bactérias produtoras de ácido-indol-acético (AIA), solubilizadoras de fosfato e fixadoras de nitrogênio.....	61
2.3.8	Índice de emergência de plântulas.....	66
2.3.9	Ensaio de promoção de crescimento de planta <i>in vivo</i>	67
3	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS.....	91

RESUMO

Diversidade da comunidade bacteriana endofíticas de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico

Tecidos vegetais, incluindo as sementes, são habitados por microrganismos denominados endofíticos, cuja interação com a planta pode conferir características vantajosas ao hospedeiro. Sabe-se que o crescimento de plantas é influenciado por fatores como a síntese de ácido-indol-acético (AIA), solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e controle de fungos fitopatogênicos. Antes da comercialização, as condições de armazenamento de sementes de soja podem restringir o desenvolvimento de microrganismos devido à baixa temperatura e umidade. Esse fato leva ao interesse de exploração de microrganismos endofíticos resistentes a essas condições. O estudo e a caracterização dessas comunidades são de grande interesse agrônomo e biotecnológico, sendo possível sua aplicação em sementes, introduzindo no campo plantas com superior potencial de produção. Com os objetivos de comparar a comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja geneticamente modificadas e convencionais; e de isolar e caracterizar essas comunidades, sementes de 12 cultivares de soja foram amostradas, de onde 3504 isolados bacterianos foram obtidos. Os isolados foram agrupados morfológicamente de acordo com a coloração e taxa de crescimento das colônias, sendo representantes de cada grupo morfológico (no total 176 isolados) agrupados pela técnica de ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado). Um total de 12 ribotipos foi observado compondo a comunidade cultivada de bactérias endofíticas de sementes de soja. Representantes destes ribotipos tiveram seus genes 16S rDNA parcialmente sequenciados, identificando os integrantes desta comunidade como: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Citrobacter* sp., *Curtobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Methylobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Micromonospora* sp., *Pantoea* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Streptomyces* sp. e *Tsukamurella* sp. A comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja provenientes de plantas geneticamente modificadas apresentou uma diversidade maior comparada à comunidade bacteriana de plantas convencionais. Em relação ao potencial biotecnológico desta comunidade, os resultados demonstraram que os isolados foram capazes de controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos por antagonismo (18%), sintetizar AIA (100%), solubilizar fosfato (39%) e fixar nitrogênio (18%). Os isolados com os melhores resultados nas análises *in vitro* foram inoculados em sementes de soja e avaliados em casa de vegetação quanto à habilidade de promover o crescimento das plantas. As plantas apresentaram diferentes respostas à inoculação das bactérias. A maior parte dos tratamentos mostrou influência negativa das bactéria nas plantas, enquanto que um isolado de *Enterobacter* sp. aumentou a massa da matéria seca de raiz. Mesmo não diferindo estatisticamente, alguns isolados mostraram tendência de aumento e outros de diminuição de biomassa da planta.

Palavras-chave: AIA; Solubilização de fosfato; Fixação de nitrogênio; ARDRA; 16S rDNA

ABSTRACT

Endophytic bacterial community diversity of soybean seeds and its biotechnological potential

Plant tissues, including seeds, are inhabited by microorganisms called endophytes, whose interaction with the plant can offer advantages to the host. It is known that plants growth promotion is induced by indole acetic acid (IAA) synthesis, phosphate solubilization and nitrogen fixation, among others. The control of phytopathogenic fungi is also related to a good plant development. Before commercialization, the seed storage conditions can restrict the development of microorganism, due to the low temperature and humidity. This fact leads to the interest of exploring resistant microorganisms to those conditions. The study and the characterization of these communities are of great agronomic and biotechnological interest, being possible its application onto seeds, introducing in the field plants with a greater production potential. In this context, the aim of this study was to isolate and identify the endophytic bacteria community in soybean seeds and study the capacity of these isolates to promote growth in the host plant, including: phosphate solubilization, nitrogen fixation, IAA synthesise and antagonism against phytopathogenic fungi. From seeds of 12 cultivars, 3504 bacteria were isolated. The isolates were morphologically grouped according to the coloration and growth rate of the colony. Representatives of each morph group, totalizing 176, were analyzed using the Amplified Ribosomal Restriction Analysis (ARDRA) technique. A total of 12 ARDRA ribotypes were observed in the cultivable endophytic community of soybean seeds. Representatives of each ribotype had their 16S rDNA gene partially sequenced, allowing to the identification of the members of this community as: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Citrobacter* sp., *Curtobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Methylobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Micromonospora* sp., *Pantoea* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Streptomyces* sp. and *Tsukamurella* sp. The endophytic bacterial community of soybean seeds from genetically modified plants showed a greater diversity compared to the bacterial community of conventional seeds. In relation to the biotechnological potential of the community, the outcomes demonstrate that the isolates were able to antagonist phytopathogenic fungi (18%), synthesise IAA (100%), solubilize phosphate (39%) and fix nitrogen (18%). The isolates with best *in vitro* outcomes were inoculated onto seeds and tested in greenhouse for their ability to promote growth in soybean. The plants answered differently to the inoculation of each bacterial isolate. The major part of the treatments demonstrated a negative influence of bacteria onto plants, while one *Enterobacter* sp. isolate increased the dry mass weight of roots. Even not differing statistically, some isolates showed a tendency to increase, meanwhile others to decrease the biomass of the plant.

Keywords: IAA, Phosphate solubilization, Nitrogen fixation, ARDRA, 16S rDNA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Gel de agarose com os perfis de bandas dos grupos obtidos pela digestão da PCR 16S rDNA com a enzima de restrição *Mbo*I. Cada canaleta representa um ribotipo. M = marcador molecular de 1Kb..... 52
- Figura 2 - Análise de rarefação das sequências analisadas; diferentes níveis de similaridade para a determinação das UTOs (únicas, 99%, 97% e 95%)..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fungos fitopatogênicos utilizados no experimento de antagonismo.....	42
Tabela 2 -	Densidade bacteriana total (média) no isolamento de bactérias endofíticas de sementes de 12 cultivares de soja, em dois experimentos realizados pelo método de trituração.....	47
Tabela 3 -	Densidade bacteriana total (média) no isolamento de bactérias endofíticas de sementes, em 12 cultivares de soja, pelo método de separação de cotilédones..	48
Tabela 4 -	Identificação (gênero), distribuição e frequência dos gêneros de bactérias endofíticas de sementes de soja geneticamente modificadas e convencionais...	51
Tabela 5 -	Distribuição e frequência das Famílias nos ribotipos obtidos por ARDRA.....	53
Tabela 6 -	Classificação das sequências obtidas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos dentro dos tratamentos e valores de cobertura ecológica.....	55
Tabela 7 -	Índices de diversidade e riqueza obtidos a partir da análise das sequências parciais do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja.....	57
Tabela 8 -	Tipos de interação entre os isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja e fungos fitopatogênicos.....	60
Tabela 9 -	Identificação, tratamento, produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja. Os dados foram originados de três repetições e valores da mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.....	62
Tabela 10 -	Efeito da inoculação de sementes de soja com bactérias endofíticas no desenvolvimento de plântulas aos 35 dias e na ocorrência de deficiência de cobre.....	69

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tem posição de destaque na agricultura mundial, com um rendimento anual de aproximadamente US\$ 215 bilhões (ESTADOS UNIDOS, 2008). Os Estados Unidos possuem a maior produção mundial de soja, seguido pelo Brasil, com 38% da safra mundial (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2008). O chamado complexo soja é responsável por aproximadamente 40% das exportações do agronegócio brasileiro, sendo que em 2007 o país exportou o equivalente a US\$ 11,3 bilhões (BRASIL, 2008; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS - ABIOVE, 2008). Além da alimentação humana, o grão de soja é empregado em diversos setores, como na produção de ração, óleo, resinas, cosméticos, tintas e biodiesel. Porém, existem limitações na cultura, como o alto custo de insumos e a grande quantidade de fertilizante requerida (DÖBEREINER, 1997). Sendo assim, as pesquisas com fontes alternativas de incorporação de nutrientes têm ganhado investimentos, assim como pesquisas envolvendo metodologias alternativas de controle de patógenos, principalmente com enfoque no uso de microrganismos que ocorrem naturalmente em associação com os vegetais, os endófitos. Estes microrganismos interagem e podem conferir vantagens ao hospedeiro, colaborando com o controle biológico e com o crescimento da planta por meio da produção de fitohormônios e outros compostos, e podem estar presentes nos mais variados tecidos e órgãos de plantas, inclusive nas sementes (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Durante o processo de produção de sementes, a soja passa por uma secagem para ser armazenada em condições ideais de temperatura e umidade, reduzindo o desenvolvimento de patógenos (SOAVE; MORAES, 1987). Porém, essas condições podem restringir também o desenvolvimento de microrganismos endofíticos. Portanto, é de grande interesse a exploração de bactérias endofíticas resistentes a essas condições, visando a sua posterior aplicação em sementes para a introdução no campo, visando plantas com potencial superior de produção. Para tanto, foram realizadas análises de controle ou inibição de fungos fitopatogênicos, síntese de ácido-indol-acético (AIA), solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio com as bactérias isoladas de sementes de soja. Além disso, foi analisada a capacidade de promoção de crescimento de plantas de soja em casa de vegetação por meio da inoculação das bactérias em sementes. Isolados com essas características são potenciais candidatos de aplicação à agricultura como alternativa ao

uso de alguns outros insumos agrícolas, além de colaborar com a manutenção da sustentabilidade, diminuindo o uso de agroquímicos. Assim, este trabalho teve como principal objetivo isolar e identificar a comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja, bem como estudar o potencial biotecnológico desses isolados bacterianos, além de comparar a comunidade bacteriana endofítica destas sementes provenientes de plantas geneticamente modificadas e convencionais.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A cultura da soja

A planta de soja é uma dicotiledônea herbácea pertencente à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e ao gênero *Glycine* L., que compreende 15 espécies. Tais plantas podem atingir até 1,5m de altura, são de crescimento ereto e cerrado. O ciclo anual da soja inicia-se com as chuvas, e se desenvolve pelo período de 80 a 200 dias, dependendo da cultivar. Apresenta basicamente dois estádios de desenvolvimento, o vegetativo (estabelecimento e desenvolvimento) e reprodutivo (florescimento e maturação) (NEUMAIER et al., 2000). Os frutos são vagens achatadas e curtas que compreendem de duas a cinco sementes elípticas ou achatadas e de coloração variável. O sistema radicular é composto por uma raiz pivotante com ramificações e nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (MULLER, 1981).

O centro de origem da soja é a China, onde essa espécie é cultivada há mais de cinco mil anos, desempenhando grande papel na estabilidade do desenvolvimento e nutrição do povo chinês (EMBRAPA, 2003; CÂMARA, 1998). O primeiro relato da cultura da soja na América data de 1804, sendo utilizada como forrageira e produtora de grãos e seu cultivo e utilização foram expandidos até 1930, quando apresentou produção quase que totalmente voltada para grãos (BONETTI, 1977). A soja foi introduzida no Brasil em 1882 (D'UTRA, 1882, Apud MIYASAKA; MEDINA, 1981) e, somente dez anos depois foi cultivada pela primeira vez pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), estado de São Paulo, que deu início às pesquisas com essa cultura no país. A cultura teve sucesso no sul do país, intensificando as pesquisas e as exportações a partir de 1949 (MYASAKA; MEDINA, 1981; BONETTI, 1977). Nas décadas de 70 e 80, a cultura foi expandida para as regiões do Brasil Central, graças ao desenvolvimento de cultivares adaptados à região (CÂMARA, 1998; BONETTI, 1977). A soja produzida atualmente é resultado de constantes programas de melhoramento genético que visam plantas mais produtivas e resistentes a patógenos e pragas, o que viabiliza seu cultivo em quase todos os estados brasileiros. A cultura é responsável pelo rendimento de U\$ 215 bilhões/ano, sendo seu maior produtor os Estados Unidos, com uma produção de 86,77 milhões de toneladas na safra 2006/2007, seguido

pelo Brasil que, na mesma safra, produziu 58,4 milhões de toneladas (CONAB, 2008; ESTADOS UNIDOS, 2008) em 20,687 milhões de hectares plantados, equivalendo a 38% da produção mundial. O principal estado brasileiro produtor de soja é o Mato Grosso, seguido do Paraná. A soja brasileira é destinada à produção de grãos, farelo, óleo e sementes, formando o chamado complexo soja, responsável por aproximadamente 40% das exportações do agronegócio brasileiro (BRASIL, 2008; ABIOVE, 2008). Embora existam fatores negativos, há boas perspectivas de avanços na produção de soja no Brasil, principalmente devido à abundância de terras aptas ao cultivo e a demanda da produção de biodiesel (EMBRAPA, 2008).

A soja Roundup Ready (RR) foi desenvolvida pela empresa Monsanto na década de 80 do século XX (MONSANTO, 2008). A tecnologia da soja geneticamente modificada para resistência ao glifosato (soja RR) simplificou o manejo de plantas infestantes, bastando a aplicação de apenas um herbicida ao invés de misturas formuladas ou outros herbicidas para o seu controle (EMBRAPA, 2008), diminuindo o custo de produção e o número de aplicações (MONSANTO, 2008).

2.1.2 Sementes

Semente, por definição, é um meio de dispersão de plantas superiores capaz de se movimentar passivamente, que sob condições ideais germina, propagando a espécie. Geralmente contidas em frutos, as sementes são resultantes da propagação sexuada e formadas pelo amadurecimento do óvulo, posteriormente à fecundação. A semente é basicamente composta de uma testa ou casca, com função de proteção; endosperma (reserva nutricional) e o embrião, constituído de um eixo embrionário com células meristemáticas com um ou dois cotilédones, que também são fontes de nutrientes para o embrião e para a plântula em crescimento. A germinação da semente começa com a emergência da radícula e depende de vários fatores: embebição da semente, presença de oxigênio, condições ideais de temperatura, ausência de impedimento mecânico da superfície do solo, ausência de ataque de microrganismos patogênicos e, dependendo da espécie, de outros fatores como luz e quebra da dormência (FELIPPE, 2007).

O endosperma das sementes é rico em nutrientes fundamentais para alimentar a plântula resultante da sua germinação. Devido ao grande valor nutricional das sementes, o homem tem

usado esses grãos como alimento. Assim, atualmente, cerca de 90% dos alimentos são produzidos por meio de sementes (MENTEN, 1991). Os termos “sementes” e “grãos” se destinam apenas à identificação das formas de utilização, pois botanicamente não há distinção. Porém, os atributos de qualidade das sementes e grãos são diferentes, como por exemplo, o fato de que as sementes devem atingir requisitos mínimos de pureza varietal e germinação, aspectos não considerados para grãos (MARCOS FILHO, 2005).

A semente de soja é o mais rico alimento vegetal, contendo cerca de 40% de massa protéica, 20% de óleo e os nove aminoácidos essenciais (FELIPPE, 2007). Devido a abundância de nutrientes, a soja também é alvo de ataque de microrganismos patogênicos, principalmente fungos. Um dos fatores limitantes na sua produção é o fato das sementes funcionarem como principal veículo de disseminação, o que leva a introdução de microrganismos em áreas de cultivo livres de certos patógenos, dando início a doenças epidêmicas, muitas vezes com sementes infectadas sem exibir sintomas (MENTEN, 1991). O controle de patógenos no estágio de sementes é uma medida relevante, uma vez que raramente causam a morte das sementes na fase pré-emergente no solo, sendo disseminados a partir de plantas jovens infectadas (MACHADO, 2000). Para evitar a introdução de patógenos em novas áreas de cultivo, as sementes são beneficiadas e armazenadas em condições de temperatura e umidade adequadas. Além da presença de possíveis patógenos, na semente existe uma microbiota que pode ser instalada por meio de correntes de ar, respingos de chuva, solo, ou mesmo ser transmitida da flor para a semente. Processos como colheita, armazenamento, o uso de maquinário agrícola e a poeira são outros veículos comuns de introdução de microrganismos em sementes (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 1968). Esses microrganismos são chamados de epifíticos e endofíticos. As condições de temperatura e umidade durante o armazenamento das sementes visam inibir o desenvolvimento de patógenos (WETZEL, 1987) podendo selecionar, também, endofíticos resistentes às condições controladas.

2.1.3 Comunidade bacteriana endofítica associada às plantas

Microrganismos endofíticos são todos aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultivados ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos tecidos vegetais (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). São divididos em dois tipos: Tipo I, que não produzem estruturas externas à planta e Tipo II, que produzem estruturas externas à planta (MENDES; AZEVEDO, 2007). Os endofíticos diferenciam-se dos microrganismos denominados epifíticos, ou epífitos, que habitam a superfície de órgãos e tecidos. Peixoto Neto; Azevedo e Araújo (2002) argumentam que as distinções entre endofíticos, epifíticos e patógenos são meramente didáticas, pois variações ambientais e fisiológicas do hospedeiro podem mudar o comportamento do microrganismo, transformando um patógeno em endófito latente, do mesmo jeito que um microrganismo epifítico pode ser classificado como endofítico se eventualmente alojar-se no interior de um tecido vegetal.

A instalação de um microrganismo endofítico no hospedeiro pode ocorrer de várias formas; ativamente pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam a sua penetração ou por meio de aberturas naturais como estômatos, hidatódios, ferimentos (DÖBEREINER et al., 1993), via raiz e sementes, chegando a diferentes tecidos e colonizando a planta de maneira sistêmica, demonstrando a habilidade de se adaptarem a nichos ecológicos específicos, rizosfera, filosfera, antosfera (HALLMANN et al., 1997) ou espermosfera (LUZ, 1998). Mesmo colonizando sistemicamente a planta, as bactérias endofíticas apresentam preferência de colonização por certos tecidos. Kuklinsky-Sobral et al. (2004) observaram, em soja, que a densidade e a diversidade de bactérias endofíticas variam de acordo com o tecido, fase de desenvolvimento da planta, mudanças sazonais e genótipo do hospedeiro, onde a densidade bacteriana observada foi maior na raiz e menor em folhas. As bactérias endofíticas podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2004). A íntima relação planta-endófito tem apresentado características interessantes para a aplicação biotecnológica e agrícola, como a promoção de crescimento em plantas, pois esta relação traz benefícios para ambos, ou seja, a bactéria pode disponibilizar nutrientes para a planta, como por exemplo, por meio da fixação biológica do

nitrogênio (FBN), enquanto que esta fornece exsudados ricos em carbono para a bactéria (NEVES; RUMJANEK, 1998).

Bactérias estão entre os principais e mais abundantes grupos de microrganismos que interagem com as plantas. Existem espécies predominantes em determinados hospedeiros e espécies secundárias ou mais raras. Essa predominância varia de acordo com o hospedeiro e algumas espécies são frequentemente isoladas de diferentes hospedeiros, demonstrando serem adaptadas a diferentes microambientes (ISAAC, 1992). Embora grupos muito variáveis tenham sido isolados ou apenas identificados por métodos independentes de cultivo, alguns grupos são mais frequentemente isolados de diferentes espécies de plantas: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (HALLMANN et al., 1997).

As plantas interagem constantemente com diversos microrganismos, podendo apresentar uma relação negativa, neutra ou benéfica. A relação endófito-plantas ainda não é inteiramente compreendida, mas sabe-se que existem relações aparentemente neutras e outras benéficas (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Entretanto, em alguns casos as relações podem ser deletérias para o hospedeiro, principalmente em casos onde haja um desequilíbrio populacional na comunidade. Dentre as diversas interações entre endófitos e plantas, pode-se citar: controle biológico de insetos e fitopatógenos (MELO, 1998), toxicoses em herbívoros causadas pela ingestão de plantas com endofíticos produtores de toxinas (WOLFE et al., 1998), modificações fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, patogenicidade e indução de resistência (KLOEPPER et al., 1997). A colonização das plantas pelos endofíticos é um fenômeno assintomático, ou seja, não causa injúrias ao hospedeiro, sendo seu isolamento feito a partir de tecidos vegetais saudáveis (PEREIRA, 1993a). Portanto, plantas saudáveis eram tidas como livres de microrganismos até que a descoberta desses fosse constatada pelos estudos de Trevet; Hollis (1948). Bary, 1866 apud Azevedo (1998) distinguiu pela primeira vez, os microrganismos endofíticos dos patogênicos, mas apenas na década de 1970 o seu potencial de aplicação biotecnológica ficou evidente.

O estudo de endofíticos, tradicionalmente, foi baseado em técnicas de isolamento desses microrganismos em meios de cultura. Entretanto, nos últimos anos, com o avanço das técnicas moleculares, tem sido possível investigar aqueles que não são cultiváveis ou de natureza fastidiosa, possibilitando o estudo do material genético a partir de amostras coletadas no ambiente. A disponibilidade aos endofíticos cultiváveis se dá por meio do isolamento a partir de

tecidos aparentemente saudáveis, evitando o isolamento de patógenos. O processo de isolamento é basicamente, composto de uma assepsia superficial do tecido para excluir os microrganismos epifíticos, seguido da fragmentação do tecido e sua transferência para meio de cultura adequado em placas de Petri. Variações no método de isolamento podem ocorrer de acordo com o tecido da planta e com o objetivo do isolamento (ARAÚJO et al., 2001). Neste tipo de estudo, testes preliminares devem ser feitos para determinar os tempos ideais de assepsia dos tecidos, visando a eliminação dos epifíticos sem afetar os endofíticos (PEREIRA, 1993a; SHULTZ et al., 1993). O estudo de sequências do gene rDNA 16S é de grande utilidade para a identificação e classificação filogenética de procariotos. Baseado neste gene, Sun et al. (2008) amostraram a comunidade bacteriana endofítica da raiz de arroz (*Oryza sativa* L.), enquanto que Thomas et al. (2008) identificaram bactérias endofíticas de plântulas de banana. Mesmo sendo estudada, a enorme diversidade endofítica ainda tem muito a ser explorada (PROSSER et al., 2007). Presente em diversos tecidos vegetais torna-se interessante um maior entendimento sobre a presença de endófitos em sementes de importantes culturas como a soja, uma vez que as sementes possam constituir reservatórios de microrganismos, principalmente dos patogênicos em condições não ideais de armazenamento. Esses endófitos tornam-se de interesse biotecnológico e agrônômico para a aplicação em sementes, uma vez que resistem às condições de armazenamento.

2.1.4 Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas

Os microrganismos são de fundamental importância para o equilíbrio ecológico devido às suas funções nos ciclos naturais, na degradação de resíduos e outros processos, o que os torna importantes na prospecção de atividades biotecnológicas. A partir de suas transformações metabólicas podem ser obtidos produtos de valor comercial como fármacos, corantes, enzimas, alimentos e outros. Além de serem recicladores naturais, interagem com microrganismos patogênicos inibindo o crescimento destes, sendo uma importante ferramenta de controle de patógenos e pragas em culturas agrícolas (controle biológico) (AZEVEDO, 1998). A elucidação das funções ecológicas das bactérias endofíticas pode trazer benefícios, em especial à exploração do potencial biotecnológico desses microrganismos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002), como promoção de crescimento vegetal. A inoculação de bactérias endofíticas tem

mostrado efeitos positivos no crescimento de plantas. Baldani et al. (2000) confirmaram o potencial de uso de bactérias diazotróficas na agricultura, inoculando bactérias fixadoras de nitrogênio em plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas. O inóculo proveniente de misturas de endófitos também tem demonstrado bons efeitos no crescimento de plantas (OLIVEIRA et al., 2000). As características de potencial de promoção de crescimento podem ser analisadas nos microrganismos por meio de técnicas moleculares com a amplificação de genes envolvidos com as características desejadas. Os testes bioquímicos são também úteis na busca de microrganismos com a capacidade de produção de ácido-indol-acético (AIA), solubilização de fosfato, fixação de N_2 (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), indução de resistência sistêmica, controle biológico de pragas e doenças (RAMAMOORTHY et al., 2001) e produção de sideróforos e antibióticos (COMPANT et al., 2005).

2.1.5 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos

Os mecanismos de ação dos microrganismos podem ser diretos (produção de fitorreguladores ou fixação do nitrogênio atmosférico) ou indiretos (como antagonistas a patógenos ou resistência a drogas) (DI-FIORE; DEL GALLO, 1995; CHANWAY, 1998). Seguem alguns dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas por microrganismos.

2.1.5.1 Controle biológico

À medida em que a agricultura aumenta, o uso de agroquímicos cresce, causando efeitos negativos como impactos ambientais e a resistência de patógenos (GERHARDSON, 2002). Devido a problemas decorrentes do uso de agroquímicos, métodos alternativos não-poluentes têm ganhado atenção, em especial o controle microbiano de pragas, que apesar de eficiente e seguro, não deve ser utilizado como única forma de controle (ALVES; MOINO; ALMEIDA, 1998). Dessa mesma maneira, existe uma tendência em diminuir o uso dos produtos agroquímicos, pois além do alto custo para o produtor, o consumidor tem exigido cada vez mais alimentos de melhor qualidade e menos conteúdo de moléculas sintéticas. Neste contexto, o controle biológico tem ganhado

atenção, sendo considerado uma alternativa ou um complemento no controle de pragas e doenças, sendo neste ponto, os microrganismos endofíticos alvo de exploração como fonte de agentes de biocontrole (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000). O controle biológico de pragas e doenças consiste no uso de microrganismos que atuam como antagonistas aos agentes causadores de prejuízos em plantas (AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI, 2000). Os mecanismos de controle biológico podem ser por competição por um nicho ecológico ou por substrato, pela produção de moléculas inibitórias, por indução de resistência sistêmica no hospedeiro contra patógenos ou contra estresses abióticos (GLICK, 1995).

As bactérias, em especial o gênero *Bacillus*, têm participação significativa dentre os produtos de controle biológico comercializados. Até 50% desses produtos são formulações bacterianas, de diversas espécies de *Bacillus*. Além do uso de bactérias entomopatogênicas, existem diferentes mecanismos de ação das bactérias contra fitopatógenos, entre eles a competição por nutrientes, nichos e ferro, produção de sideróforos, antibiose, produção de enzimas como quitinases e indução de resistência sistêmica (COMPANT et al., 2005). Segundo Alves; Moino Jr; Almeida (1998), muitas dessas bactérias ainda são desconhecidas e poderão ser isoladas para o controle de diversas pragas importantes que ocorrem no campo ou na área urbana, onde inseticidas químicos são ineficientes ou se tornam indesejáveis. A capacidade de adaptação a nichos similares àqueles ocupados por fitopatógenos faz das bactérias endofíticas uma ferramenta adequada para o controle biológico (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005). A identificação de diferentes mecanismos de ação dos microrganismos de controle biológico pode levar à combinação de isolados para o controle de amplo espectro de pragas ou patógenos (LUTZ et al., 2004; RAUPACH; KLOPPER, 1998). A biotecnologia também pode contribuir para o controle biológico, transformando microrganismos para que expressem mais de um gene responsável por características desejáveis, combinando diferentes mecanismos de ação (TIMMS-WILSON et al., 2000). Pelo fato de colonizarem nichos ecológicos similares aos de fitopatógenos, as bactérias endofíticas podem ser usadas como agente de controle biológico. Berg et al. (2005) descrevem bactérias endofíticas associadas a batata no controle de fungos fitopatogênicos. Diversos trabalhos têm descrito o uso de microrganismos endofíticos no controle biológico de doenças. Senthilkumar et al. (2007) descrevem o uso de *Paenibacillus* sp., isolado de nódulos de soja, na inibição do crescimento de *Rhizoctonia bataticola* por meio da produção de antibióticos. Endofíticos de crescimento rápido têm grande potencial para serem utilizados no controle biológico, uma vez que

são capazes de colonizar nichos específicos e inibir, por competição ou antibiose, o desenvolvimento dos fitopatógenos. Em tomate, *Fusarium oxysporum* pode ser controlado com *F. oxysporum* avirulento, que coloniza endofiticamente o hospedeiro. Microrganismos endofíticos podem atacar patógenos também pela produção de enzimas líticas, como quitinases e proteases. No entanto, neste caso o contato entre o patógeno e o endofítico é necessário, ao contrário do controle biológico pela indução de resistência (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

2.1.5.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

Uma das aplicações de bactérias endofíticas é na fixação biológica de nitrogênio (FBN) (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). O nitrogênio atmosférico (N_2) é pouco reativo e não pode ser metabolizado pelas plantas, que dependem de bactérias chamadas diazotróficas, que possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, para transformar o N_2 em amônia, subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas. O processo de FBN geralmente ocorre por meio de bactérias do gênero *Rhizobium*, que em contato com as raízes de leguminosas, formam nódulos que disponibilizam o nitrogênio atmosférico às plantas. Enquanto a bactéria disponibiliza o nitrogênio para a planta, esta fornece exsudados ricos em carbono. A relação simbiótica entre leguminosas e *Bradyrhizobium* é conhecida como a mais eficiente na FBN, muito importante para a agricultura e, conseqüentemente a mais estudada (NEVES; RUMJANEK, 1998).

O nitrogênio é o nutriente exigido em maior abundância pela soja e a disponibilidade deste nutriente para a cultura é dada por meio de fertilizantes nitrogenados e pela fixação biológica do nitrogênio (HUNGRIA et al., 2001). O alto custo de fertilizantes nitrogenados para a produção tem prejudicado os lucros dos produtores. No entanto, o Brasil é o país no mundo que demanda, em média, a menor dose de fertilizantes nitrogenados, pois, mesmo com os solos pobres em nitrogênio, o elevado custo deste insumo impede a sua utilização de forma ideal (DÖBEREINER 1997). Devido a esses fatores, associados à conscientização ecológica sobre o uso intensivo de agroquímicos, o potencial da FBN tem sido alvo de atenção (NEVES; RUMJANEK, 1998). No Brasil, a FBN na cultura da soja tem ganhado importância, pois diminuiu significativamente o uso de fertilizantes nitrogenados a partir do desenvolvimento de inoculantes com linhagens de *Rhizobium* (ALVES; DODDEY; URGUAGA, 2003), onde até 94% do nitrogênio requerido pode

ser disponibilizado por meio da FBN (HUNGRIA et al., 2006). Além de Rhizobiaceae, outras espécies diazotróficas têm sido descobertas, não apenas associadas leguminosas ou a raízes, mas associadas a outras partes de plantas como colmos, associadas às gramíneas ou até de vida livre no solo. Essas associações simbióticas têm sido muito estudadas, buscando a seleção de isolados com características favoráveis à inoculação artificial em sementes, como tolerância a estresses e com alta capacidade de nodulação.

2.1.5.3 Bactérias produtoras de ácido-indol-acético (AIA)

A produção de fitohormônios por bactérias é um mecanismo de promoção de crescimento de plantas (BUCHENAUER, 1998). Auxinas são hormônios capazes de exercer função na regulação do crescimento de plantas, aumentando o crescimento radicular e melhorando a absorção de nutrientes (LAMBRECHT et al., 2000). São produzidas nas plantas, principalmente no meristema apical e transportadas por meio de células do parênquima até as raízes (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). O ácido indol-acético (AIA) é a auxina mais abundante dentre os fitohormônios (BARTEL, 1997) e também pode ser sintetizada por diversos microrganismos. Aparentemente sem função na célula microbiana, a produção de AIA pode ser resultado da evolução da interação de bactéria-plantas (PATTEN; GLICK, 2002) e pode ser influenciada por fatores como genótipo, tanto do hospedeiro quanto do microrganismo (JAIN; PATRIQUIN, 1985). A produção de AIA por bactérias pode ser estimulada pelo triptofano, um precursor da sua biossíntese, que aumenta o crescimento celular ou pode ser consumido como fonte de nitrogênio, estimulando a multiplicação celular (TIEN et al., 1979).

Associadas à plantas, têm sido descritas bactérias produtoras de AIA relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal, como *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, entre outras (COSTACURTA; VANDERLEYDEN, 1995; PATTEN; GLICK, 1996). Já Lata et al. (2006) descreveram *Pseudomonas stutzeri* endofítica produtora de AIA, isolada a partir de *Echinaceae*. Dada a importância das bactérias sintetizadoras de AIA, tem-se buscado isolados capazes de produzir este hormônio, visando uma possível aplicação das bactérias em diversas culturas.

2.1.5.4 Solubilização de fosfato inorgânico

Depois do nitrogênio, o fósforo é o nutriente mais limitante para o desenvolvimento das plantas, onde apresenta função estrutural (BARROTI; NAHAS, 2000; GYANESHWAR et al., 2002) e de maturação dos frutos (GARCÍA, 1993). Apesar dos solos serem ricos em fósforo, apenas uma pequena parte é disponível para as plantas, uma vez que a maior parte do fósforo é encontrada em formas insolúveis, e as plantas são capazes de absorvê-lo apenas em formas solúveis. Alguns microrganismos podem ser utilizados para aperfeiçoar o aproveitamento do nutriente, uma vez que solubilizam o fosfato, tornando-o disponível para a planta absorvê-lo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Dentre esses microrganismos encontram-se as bactérias solubilizadoras de fosfato, que participam do ciclo do fósforo facilitando a conversão de formas insolúveis para solúveis por meio da secreção de ácidos orgânicos e fosfatases (KIM; JORDAN; MCDONALD, 1998), tornando-o disponível para a planta (GYANESHWAR et al., 2002). Dentre as bactérias solubilizadoras de fosfato encontram-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

2.1.6 Influência da transgenia na comunidade bacteriana endofítica

Acredita-se que a introdução de plantas geneticamente modificadas (PGMs) em um novo ambiente possa levar ao desequilíbrio microbiano devido à liberação do produto do transgene no ambiente ou até à transferência horizontal de genes, introduzindo genes (como por exemplo o de resistência a antibióticos) no ambiente, alterando a frequência gênica e, conseqüentemente, alterando a comunidade bacteriana (GEBHARD; SMALLA, 1998). A transgenia pode afetar a comunidade bacteriana associada à planta diretamente, pela expressão de genes que afetam os microrganismos ou indiretamente, quando ocorrem mudanças metabólicas na planta que afetam os microrganismos (HEUER; SMALLA, 1997). Acredita-se que PGMs possam influenciar, inclusive, a microbiota do solo e a fisiologia da planta, alterando a relação hospedeiro-bactéria, modificando a colonização endofítica da planta. Essa hipótese é baseada nas diferenças na quantidade e composição dos exsudados liberados pelas raízes da planta geneticamente modificada (PGM) ou

devido às alterações de práticas de cultivo para estas plantas (MOTAVALLI et al., 2004). A comunidade bacteriana endofítica pode ser afetada por diversos fatores e a transgênese tem sido largamente estudada como possível influenciador na comunidade. Assim, há necessidade de estudos de interferência de plantas geneticamente modificadas nas comunidades bacterianas (ARAÚJO; ROSSETTO; KUKLINSKY-SOBRAL, 2008). O efeito da transgenia em comunidades bacterianas tem sido demonstrado em diferentes espécies. Andreote et al. (2008) demonstram a influência da transgênese na comunidade bacteriana endofítica da rizosfera de tabaco, que demonstrou ter influência durante o primeiro mês de desenvolvimento da planta, porém aos três meses a estrutura da comunidade bacteriana havia se restabelecido. No entanto, outros fatores, além da transgenia, são mais determinantes na comunidade bacteriana (HEUER et al., 2002). Andreote et al. (2008) sugerem o genótipo do hospedeiro como uma das principais influências na comunidade bacteriana associada às plantas.

2.1.7 Análise do gene 16S rDNA para estudos de diversidade em comunidades bacterianas

Os microrganismos possuem uma enorme variabilidade genética adquirida durante a sua evolução, o que lhes confere a capacidade de adaptação a diversos ambientes. Porém, algumas regiões do seu genoma foram mantidas conservadas, permitindo seu estudo taxonômico por meio de técnicas moleculares (SEGHERS et al., 2003). Woese; Kandler e Wheelis (1990) sugeriram, baseados na sequência dos genes ribossomais, uma nova classificação dos seres vivos, até então classificados em cinco reinos por Whittaker (WHITTAKER, 1969 apud PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Em procariotos, o gene mais analisado é o 16S rDNA (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995), fundamental para o estudo molecular de bactérias e arqueias, onde é considerado como cronômetro evolutivo (ROSADO et al., 1997). Este gene apresenta poucas variações nas diferentes espécies ao longo dos seus quase 1,4Kb. É geneticamente estável e apresenta um tamanho suficiente para análises filogenéticas (SEGHERS, 2003). A análise da sequência de DNA do gene 16S rDNA permite correlacionar a ocorrência dos genótipos e os ambientes onde são encontrados (CHENEBY et al., 2000). Com sua análise é possível inferir a relação evolutiva entre espécies de bactérias, além de identificá-las (WOESE, 1987). A molécula

16S rDNA tem os nucleotídeos altamente conservados para diferentes espécies e possuem outras regiões variáveis, denominadas regiões hipervariantes (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

Várias técnicas são usadas na análise da região 16S rDNA, entre elas o ARDRA (Análise de Restrição de DNA ribossomal amplificado), que, baseada em padrões de restrição enzimática, revela polimorfismos nos fragmentos do DNA obtidos de diferentes isolados (GRIFONI et al., 1995). Essa técnica permite agrupar e diferenciar bactérias por padrões de bandas, revelando os grupos mais representativos em uma determinada amostra (HEYNDRICKX et al., 1996; van ELSAS et al., 1998). O sequenciamento dos nucleotídeos dessa região permite uma avaliação detalhada do gene, sendo consideradas da mesma espécie aqueles que possuem mais de 97% de homologia do DNA da região 16S rDNA.

2.1.8 Tratamento biológico de sementes

O tratamento de sementes visa eliminar os patógenos de sementes e protegê-las, assim como proteger as plântulas dos patógenos do solo, melhorando a qualidade sanitária da semente. É uma medida relativamente econômica, de fácil aplicação, eficiente e, praticamente, não apresenta efeitos maléficos sobre o meio ambiente (SOAVE; MORAES, 1987).

O tratamento de sementes é considerado, na agricultura moderna, uma das medidas mais recomendadas, pois possibilita um menor uso de defensivos químicos, além de controlar doenças na fase que antecede à implantação de uma lavoura. Dentre os tipos de tratamentos de sementes, a combinação de recursos físico, químico e biológico tem sido uma tática recomendável para o controle de inúmeros patógenos, pois nem sempre um único método propicia o controle de todos os agentes causadores de doenças, devido à sua diversidade e natureza (MACHADO, 2000).

Dentre os métodos de tratamentos de sementes, encontra-se o biológico, que baseia-se na incorporação artificial de agentes de controle biológico, com o princípio de que os microrganismos inoculados controlem a ação de patógenos da própria semente ou do solo, por meio de antagonismo (SOAVE; MORAES, 1987). Esse tipo de tratamento tem sido utilizado com sucesso, e a sua eficiência, em alguns casos, é igual ou superior a outros tipos de tratamentos (físicos ou químicos). Dentro do tratamento biológico pode-se considerar, como vantagens, a ação não poluente do método e o efeito prolongado; porém, existem limitações como manutenção das

características do agente biológico, instabilidade do antagonista, uma vez que se trata de um produto biológico. Dessa forma, é recomendada a combinação com outras formas de controle. (MACHADO, 2000). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* são exemplos de agentes de controle biológico utilizados, com sucesso, no tratamento de sementes (SOAVE; MORAES, 1987). O tratamento de sementes com agentes de controle biológico é um dos métodos mais adequados para o controle de patógenos transmitidos por sementes (LEWIS, 1991).

Uma das estratégias mais importantes usadas no controle biológico de fungos, durante o armazenamento, é a proteção das sementes por meio do uso de microrganismos antagonistas. Bresan (2003) descreve o uso de linhagens de *Streptomyces* spp. no tratamento de sementes de milho para o controle de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. durante o armazenamento.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, do Departamento de Genética, ESALQ/USP. O estudo foi conduzido com sementes de soja, gentilmente cedidas pela empresa Monsanto. Foram utilizadas 12 cultivares de soja, sendo seis geneticamente modificadas (cultivares cv 1 à cv 6) e seis convencionais (cultivares cv 7 à cv 12), com o objetivo de avaliar a possível interferência da transgenia na comunidade bacteriana endofítica das sementes. As sementes foram armazenadas em condições ótimas para o armazenamento das sementes, previamente à sua manipulação (20°C, umidade relativa do ar de 60%). Dados de local de cultivo, clima, solo, tratamentos culturais, data de colheita, período e condições de armazenamento não foram cedidos pela empresa. Os nomes das cultivares foram codificados de cv 1 a cv 12 a por solicitação da empresa.

2.2.2 Isolamentos de bactérias endofíticas de sementes de soja

Foram realizados três isolamentos bacterianos, sendo dois deles pela técnica de trituração e um pela técnica de separação de cotilédones. Os dois métodos foram comparados, objetivando o isolamento do maior número de colônias bacterianas possível. Em ambos os métodos, as sementes foram homogeneizadas e amostradas ao acaso. Foi usado meio de cultura tripticaseína de soja TSB 10% (Merck) suplementado com benomyl (benzimidazole) $50\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ visando inibir o crescimento fúngico. As sementes foram submetidas à assepsia superficial em etanol 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2,5% (2 minutos), etanol 70% (1 minuto), seguidos de duas lavagens em água destilada e esterilizada. O número total de colônias foi utilizado para determinar a densidade bacteriana em unidades formadoras de colônias (UFC/g de semente). Os três isolamentos são descritos a seguir. Para certificação da eliminação da microbiota epifítica, alíquotas da água destilada da última lavagem foram transferidas para o mesmo meio de cultura em placas de Petri e incubadas nas mesmas condições.

As densidades de bactérias endofíticas (UFC/g) dos experimentos de isolamentos obtidos de sementes de soja, foram transformadas usando \log_{10} de $X+1$ antes da análise estatística, para melhor ajuste à distribuição normal dos dados e melhor sensibilidade da análise de variância. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 12 diferentes cultivares de soja e três repetições de três placas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os métodos usados nos três experimentos de isolamento foram comparados pela correlação existentes entre eles, pelo coeficiente de determinação (r^2) da regressão linear entre os dados dos experimentos.

2.2.2.1 Isolamentos por trituração

Foram realizados dois isolamentos por trituração, onde se utilizou a massa de matéria seca de aproximadamente 7,5g (50 sementes) para cada repetição. Foram realizadas três repetições por amostra, onde cada repetição equivaleu a três placas de Petri (9 cm de diâmetro). Depois da assepsia superficial das sementes, as mesmas foram hidratadas em água destilada esterilizada por 1 hora visando facilitar a trituração. Em seguida, as sementes foram trituradas e agitadas (150

rpm) em tampão PBS (140mM de NaCl, 3mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 2mM de KH₂PO₄, pH 7,4) na proporção de 50mL de PBS para cada 7,5g de sementes, por 1 hora, a fim de permitir a completa liberação das bactérias endofíticas das sementes. Por fim, alíquotas de 100µL destas suspensões foram transferidas para meio de cultura não seletivo TSB, suplementado com ágar (1,2%) e benomil (50µg/mL⁻¹) e incubadas a 28°C, por 15 dias. Após o crescimento bacteriano, as colônias foram contadas.

2.2.2.2 Isolamento por separação de cotilédones (fragmentação)

Dezoito sementes foram retiradas ao acaso de cada amostra. Depois da assepsia superficial das sementes, o tegumento foi retirado e os cotilédones separados. De cada semente, apenas um dos cotilédones foi plaqueado, visando amostrar o maior número possível de sementes. Foram plaqueados seis cotilédones por placa em meio de cultura TSB 10% (Merck) e as placas foram incubadas a 28°C, por 15 dias, e então avaliadas (ARAÚJO et al., 2001).

2.2.3 Estoque e seleção de isolados para ARDRA

Ao final dos três isolamentos as colônias foram contadas e, devido ao grande número, optou-se por selecionar e estocar parte delas. As colônias selecionadas para serem armazenadas foram transferidas das placas de Petri para tubos contendo meio de cultura TSB 10% líquido e, então, preservadas em tubos criogênicos a -80°C com 20% de glicerol. Essa seleção foi baseada em características morfológicas, sendo que grupos visualmente semelhantes tiveram até cinco isolados de cada placa escolhidos ao acaso. Destes, parte foi selecionada e submetida à análise por meio da técnica de ARDRA.

2.2.4 PCR do gene 16S rDNA

Os isolados selecionados foram retirados do estoque a -80°C , com 20% de glicerol, transferidos para meio de cultura TSB 10% solidificado e incubados a 28°C , até o aparecimento de colônias isoladas. Com uma alça de platina, uma pequena porção de cada colônia foi colocada em microtubo contendo $200\mu\text{L}$ de água destilada e esterilizada e aproximadamente 0,1g de esferas de vidro (0,1mm *glass beads*, Biospec ProductsTM). Os tubos foram agitados em MineBeadbeaterTM (Biospec Products) por 1 minuto, a 3500 bpm, e centrifugados a 10000 rpm por 3 minutos. Foi usado $1\mu\text{L}$ do sobrenadante como DNA molde na reação de PCR.

A amplificação do gene 16S rDNA foi feita por PCR com os *primers* universais para o domínio bactéria P027F (5'GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') (HEUER et al., 1997), gerando, para cada amostra, um fragmento de aproximadamente 1400 pb. As reações foram realizadas em volume de $50\mu\text{L}$, contendo 3,75mM de MgCl_2 , 0,2mM de cada dNTP, 0,2 μM de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1x tampão da Taq DNA polimerase e $1\mu\text{L}$ do sobrenadante de bactérias. Em todas as reações foram utilizados controles negativos. A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research) programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C , seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C ; 1 minuto a $62,5^{\circ}\text{C}$; 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C . A amplificação do fragmento, de aproximadamente 1400 pb, foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) a 3 volts/ cm^{-1} em tampão TAE 1X, com marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($1,0\text{mg}/\text{mL}^{-1}$) e fotodocumentado.

2.2.5 Clivagem do gene 16S rDNA (ARDRA)

Posteriormente à amplificação da região 16S rDNA das colônias, os produtos da PCR foram clivados separadamente com duas endonucleases distintas, sendo elas *HhaI* e *MboI* (Invitrogen). Foram usadas 2U de enzima para cada $1\mu\text{g}$ de produto de PCR, em um volume total de reação de $20\mu\text{L}$, de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante. As clivagens foram incubadas à 37°C *overnight*. Em seguida, o volume todo da reação foi analisado por

eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), em tampão TAE 1X a 3 volts/cm⁻¹, com marcador de peso molecular 1000 kb DNA Ladder (Invitrogen). O gel de agarose foi corado em solução de brometo de etídio (1,0mg/mL⁻¹) e fotodocumentado. Por fim, os perfis obtidos, caracterizados pelo número e tamanho dos fragmentos amplificados, foram denominados ribotipos.

2.2.6 Identificação dos isolados bacterianos por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

A identificação dos isolados foi realizada pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. O número de isolados identificados foi determinado baseado no número de representantes de cada ribotipo, obtidos por meio da técnica de ARDRA. Foi identificado um mínimo de 14% e um máximo de 100% dos isolados de cada um dos ribotipos. Os produtos de PCR amplificados foram purificados com polietileno glicol (PEG 8000 20%; NaCl 2,5 mM). Os fragmentos de 1400 pb foram enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, USP/ São Paulo. O sequenciamento foi realizado com o *primer* 1387R (HEUER; SMALLA, 1997) e as sequências parciais, de aproximadamente 500 pb, obtidas foram comparadas com sequências originadas de linhagens tipos, presentes no banco de dados do “Ribosomal Data Project”, por meio do *software* RDPQuery (http://simo.marisci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm). Os alinhamentos e a edição das sequências foram realizados no *software* MEGA 4.0.1 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis (TAMURA et al., 2007).

2.2.7 Análise das sequências 16S rDNA

Inicialmente as sequências foram editadas e alinhadas por meio da utilização do *software* MEGA versão 4.0.1 (TAMURA et al., 2007). O alinhamento das sequências foi utilizado para a construção de uma matriz pelo *software* DNADist, no *software* Phylip (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dnadist-simple.html>). Por meio do *software* DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), foi possível estimar os índices de diversidade de Shannon-Weaver e riqueza de espécies de Chao1, bem como fornecer dados referentes ao número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), utilizados para a determinação da curva de rarefação.

Para tanto, foram consideradas diferentes níveis de similaridade para determinação das UTOs, sendo eles “únicas”, 99, 97 e 95%.

A partir de matrizes de similaridade das sequências, os dados de rarefação foram gerados pelo programa considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências parciais obtidas do gene 16S rDNA. A ocorrência de diferentes unidades taxonômicas operacionais (UTOs) é calculada e os níveis de similaridade foram de 100% para linhagens, 99% a 95% para espécies e 90% para gêneros. A riqueza e a curva de rarefação indicam o número de amostras necessárias para se ter uma cobertura satisfatória da comunidade estudada. Ainda foram calculados os níveis de similaridade, de acordo com os valores obtidos pelo *software* RDPQuery (Ribosomal Data Project - http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm). As porcentagens utilizadas na análise (classificação) do RDP foram 91% para ordem, 92% para família e 95% para gênero. A cobertura ecológica também foi calculada por meio da fórmula $C=1-(n/N)$, onde n é o número de grupos representador por apenas um indivíduo e N o número total de grupos.

2.2.8 Análise funcional das bactérias isoladas de sementes de soja

As mesmas bactérias selecionadas para a identificação foram submetidas à análise da capacidade de controlarem o crescimento de fungos patogênicos (ensaio de antagonismo), produzirem AIA (ácido-indol-acético), solubilizarem fosfato inorgânico, fixarem N_2 e promoverem crescimento de plantas.

2.2.8.1 Ensaio de antagonismo contra fungos fitopatogênicos (método da cultura pareada)

Ensaio de antagonismo *in vitro* foram realizados com o objetivo de observar bactérias endofíticas atuando na redução ou inibição do crescimento de seis diferentes fungos fitopatogênicos (Tabela 1), por meio do método da cultura pareada ou pareamento (MARIANO, 1993). Os isolados fúngicos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Patologia de Sementes – Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ-USP. Os fungos utilizados no experimento foram previamente desenvolvidos em meio de cultura Batata-

Dextrose-Ágar (BDA, pH 6,8 contendo 200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar para cada 1000 mL de água destilada). Fragmentos circulares de 1 cm de diâmetro do meio de cultura com o fungo desenvolvido na superfície foram usados nos ensaios de antagonismo. Cada bactéria foi estriada em duas extremidades, a 1 cm da borda da placa de Petri com meio de cultura BDA e, 48 horas depois, cada fungo foi transferido para o centro da mesma placa (a uma distância de 3 cm de cada estria bacteriana). O controle do experimento consistiu em placa de Petri contendo apenas o fungo. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. As placas foram mantidas a 28°C, por tempo suficiente (cerca de seis dias) para que o fungo, no tratamento controle, apresentasse crescimento micelial suficiente para atingir a borda da placa. A capacidade de inibir fungos fitopatogênicos foi feita mediante a comparação visual dos tamanhos das colônias fúngicas dos experimentos (na mesma placa que as bactérias) e dos controles (placas contendo os fungos apenas), e foram considerados quatro tipos de interação entre as bactérias e os fungos: (1) sem inibição, quando não houve qualquer mudança no tamanho ou na morfologia do fungo; (2) com halo de inibição; (3) com ação fungistática, quando o tamanho da colônia fúngica foi reduzido, ou quando, mesmo com o tamanho igual ao do controle, a produção de hifas foi reduzida; (4) com baixa esporulação, quando o tamanho da colônia permanecem normal, porém a morfologia da colônia foi modificada, com baixa esporulação.

Tabela 1 - Fungos fitopatogênicos utilizados no experimento de antagonismo

(continua)			
Identificação	Espécie	Origem	Doença
F1	<i>Fusarium semitectum</i>	soja	Podridão de sementes
F2	<i>Fusarium oxysporum</i>	feijão	Murcha de Fusarium ou Amarelecimento de Fusarium
F3	<i>Fusarium oxysporum</i>	algodão	Murcha de Fusarium
F4	<i>Fusarium verticillioides</i>	milho	Podridão rosada (espiga)

Tabela 1 - Fungos fitopatogênicos utilizados no experimento de antagonismo

Identificação	Espécie	Origem	Doença	(conclusão)
F5	<i>Phomopsis sojae</i>	soja	Seca da haste e da vagem	
F6	<i>Cercospora kikuchii</i>	soja	Crestamento foliar de cercospora e mancha púrpura da semente	

2.2.8.2 Ensaio de produção de AIA (Ácido-Indol-Acético)

A produção de AIA por bactérias foi quantificada conforme o método desenvolvido por Gordon; Weber (1950), onde o hormônio reage com o reagente de Salkowski e é medido em espectrofotômetro.

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura TSB 10% contendo L-triptofano (5mM) e incubadas no escuro, a 28°C, por 72 horas. Um mililitro de cada cultura foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm e 900 µL do sobrenadante foi misturado em cubetas com 400 µL do Reagente de Salkoviski (BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, 1991) e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000) com comprimento de onda de 530 nm (HARTMANN; SINGH; KLINGMULLER, 1983) e foi normalizada por meio de curva padrão com diferentes concentrações definidas de AIA comercial (100, 80, 60, 40, 20, 10 e 0 µg/mL). Como controle positivo de produção de AIA foi usado a bactéria *Escherichia coli* da linhagem dh5α.

O experimento de determinação de AIA (em µg.mL⁻¹) foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 62 isolados bacterianos e uma testemunha, com três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.2.8.3 Ensaio de solubilização de fosfato inorgânico

Três placas com cada bactéria foram crescidas por 48 h a 28°C em meio de cultura solidificado com adição de fosfato inorgânico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], de acordo com Verma; Ladha; Tripathi (2001) e Rodriguez; Fraga (1999). A formação de um halo transparente, em torno da colônia, indica a solubilização de fosfato pela bactéria. O tamanho do halo de solubilização de fosfato é resultante da subtração do valor do diâmetro da colônia do diâmetro total do halo (NAUTIYAL, 1999).

O experimento de solubilização de fosfato (diâmetro do halo em cm) foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 62 isolados bacterianos e uma testemunha, com três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.2.8.4 Ensaio de fixação de nitrogênio

As mesmas bactérias foram avaliadas quanto à capacidade de fixar N_2 , por meio do crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio (NFb semi-sólido). As bactérias foram transferidas para tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultura NFb, e incubadas a 28°C por 72 horas. A presença de um véu (halo) no meio de cultura indicou a fixação de N_2 pela bactéria (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Foram realizadas três repetições para cada isolado bacteriano.

2.2.8.5 Ensaio de promoção de crescimento por inoculação de bactérias endofíticas em sementes de soja

O ensaio foi conduzido com sementes de soja do cultivar Conquista. Dezesete isolados bacterianos foram selecionados para serem inoculados nas sementes, para verificar o potencial de promoção de crescimento em casa de vegetação. Cada isolado apresentou uma, duas ou três das seguintes características: capacidade de produzir AIA, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio. Dos 17 isolados, nove foram isolados de plantas geneticamente modificadas e oito de plantas

convencionais. Neste experimento, buscou-se utilizar o mesmo método descrito por Kuklinsky-Sobral (2003). Para a obtenção dos inóculos, as bactérias foram cultivadas e mantidas em 100 mL de meio líquido TSB 10% e CHOI 3 (TOYAMA, ANTHONY; LIDSTROM, 1998), por um período de 16 horas, sob agitação constante de 100 rpm. As bactérias em cultivo foram centrifugadas a 2.000 rpm, por 10 minutos, e ressuspensas em tampão PBS numa concentração de 10^6 UFC/mL. Paralelamente foi feita assepsia em sementes de soja do mesmo cultivar, por imersão das sementes em hipoclorito de sódio 2,5% diluído 3:1, seguida de cinco lavagens de 1 minuto em água destilada esterilizada. A inoculação das bactérias nas sementes foi realizada por meio da imersão das mesmas nas suspensões bacterianas e manutenção destas sob agitação de 100 rpm por 1 hora. Após este período, as sementes foram retiradas das suspensões bacterianas e semeadas em vasos (com capacidade para 900 mL, previamente lavados com hipoclorito de sódio 2,5%) contendo substrato (PlantMax Hortaliças, Eucatex) e mantidos em casa de vegetação. Anteriormente à instalação do experimento, as sementes foram submetidas ao teste de emergência segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

O experimento foi conduzido com dois controles e uma testemunha: tratamento 18 (controle padrão: sementes inoculadas com o isolado EN345 de *Pseudomonas oryzihabitans* pertencente à coleção de bactérias do laboratório no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” do Departamento de Genética, ESALQ/USP.); tratamento 19 (controle não inoculado: sementes submetidas à assepsia e em PBS, sem bactéria) e tratamento 20 (testemunha: sementes não submetidas à assepsia, não incubada em PBS e não inoculada com bactéria). Os tratamentos de 1 a 17 são referentes a sementes de soja inoculadas com diferentes isolados bacterianos. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, com 20 tratamentos e nove repetições. Cada repetição foi composta de um vaso com quatro sementes. Após seis e 12 dias de semeadura foi realizada a contagem do número de plântulas emergidas para calcular o índice de emergência de cada tratamento, com o objetivo de avaliar a influência das bactérias na germinação das sementes e no desenvolvimento das plântulas. Após 14 dias da semeadura realizou-se um desbaste, mantendo apenas as duas maiores plantas de cada vaso. O experimento foi avaliado com 35 dias após a semeadura e as plantas foram coletadas mediante retirada do substrato, com o auxílio de água corrente. Os parâmetros avaliados foram altura e massa da matéria fresca e seca da raiz e da parte aérea. Para avaliar a massa da matéria seca, as plantas foram mantidas em estufa a 60°C até a estabilização da massa e, então, foram pesadas

novamente. As características avaliadas foram: emergência, altura das plântulas acima do colo e determinação da matéria seca e fresca da parte aérea e do sistema radicular. A análise de variância foi realizada para o delineamento experimental em blocos ao acaso, com uma parcela perdida, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.2.9 Análise estatística

Os *softwares* utilizados para as análises estatísticas foram ESTAT – Sistema para análises estatísticas versão 2.0 e SAS (Copyright[©] 1989-1996 do SAS Institute, Cary, NC, USA).

Resultados e discussão

2.3.1 Isolamento de bactérias endofíticas de sementes de soja

Por meio dos métodos utilizados foi possível isolar bactérias endofíticas de diferentes grupos morfológicos a partir de sementes de soja e calcular a densidade bacteriana presente em cada cultivar. Foram isoladas 3504 bactérias, sendo 1783 (50,88%) no primeiro, 60 (1,71%) no segundo e 1661 (47,41%) no terceiro isolamento, evidenciando que a trituração é o melhor método para isolar bactérias endofíticas de sementes de soja. Das bactérias isoladas, 406 foram armazenadas e 62 identificadas. Não foram observadas colônias nas placas usadas como controle de assepsia superficial das sementes.

Nos isolamentos por trituração, a densidade de bactérias endofíticas, colonizando as sementes de diferentes cultivares, não diferiu estatisticamente (Tabela 2), principalmente devido às diferenças encontradas em sementes distintas de uma mesma cultivar, com dados variando de 0 a 467 UFC/g de tecido.

Tabela 2 – Densidade bacteriana total (média) no isolamento de bactérias endofíticas de sementes de 12 cultivares de soja, em dois experimentos realizados pelo método de trituração

Cultivares	Densidade bacteriana total* (UFC/g de tecido)
1	2,5 x 10 ² a
2	0,07 x 10 ² a
3	0,02 x 10 ² a
4	2,3 x 10 ² a
5	0,23 x 10 ² a
6	0,02 x 10 ² a
7	1,2 x 10 ² a
8	0,18 x 10 ² a
9	0,4 x 10 ² a
10	0,12 x 10 ² a
11	0,08 x 10 ² a
12	0,01 x 10 ² a
Média geral	0,59 x 10 ²
Coefficiente de variação (%)	36,2

* Os dados foram transformados por log X+10 para ser realizada a análise estatística. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O coeficiente de variação, apresentado na tabela 2, foi relativamente alto (36,2%). Em alguns casos, diferentes repetições do mesmo tratamento tiveram valores muito discrepantes, ou seja, o número de UFC/g de tecido não foi constante nas repetições do mesmo tratamento. Por exemplo, o isolamento bacteriano do tratamento um, no primeiro isolamento, variou de 0 a 100 colônias por placa. Esse fato pode ser explicado pela variabilidade das condições (como a possível presença de sementes muito colonizadas por bactérias em meio a outras não colonizadas). Esta precisão na quantificação de bactérias endofíticas pode melhorar com o aumento do número de repetições e/ou com o aumento do número de sementes por repetição. Sendo assim, os valores apresentados na Tabela 2 são estimativas das densidades bacterianas médias para sementes de soja de diferentes cultivares.

Entretanto, os isolamentos resultaram na obtenção de colônias bacterianas em número suficiente para o estudo de diversidade, objetivo do trabalho. Kuklinski-Sobral (2003) observou que a densidade bacteriana isolada de soja sofre influência de fatores como cultivar, variações sazonais, tratos culturais, estágio de desenvolvimento do hospedeiro e tecido amostrado, e isolou de 10^4 a 10^6 UFC/g, valores discrepantes comparados ao de sementes (média de $5,9 \times 10$ UFC/g) obtidos no presente trabalho.

Considerando o método de separação de cotilédones para o isolamento bacteriano, foi calculada a frequência de isolamento (número de indivíduos por número de fragmentos analisados). Estatisticamente, também não foram observadas diferenças entre as cultivares (Tabela 3).

Tabela 3 – Densidade bacteriana total (média) no isolamento de bactérias endofíticas de sementes, em 12 cultivares de soja, pelo método de separação de cotilédones

Cultivares	Densidade bacteriana total* (UFC/grama de tecido)	
1	$6,7 \times 10^{-1}$	a
2	$6,7 \times 10^{-1}$	a
3	$4,0 \times 10^{-1}$	a
4	NO**	a
5	$4,0 \times 10^{-1}$	a
6	NO**	a
7	$53,3 \times 10^{-1}$	a
8	NO**	a
9	NO**	a
10	$53,3 \times 10^{-1}$	a
11	NO**	a
12	NO**	a
Média geral	$13,4 \times 10^{-1}$	
Coefficiente de variação (%)	71,65	

* Os dados foram transformados por $\sqrt{X+1}$ para ser realizada a análise estatística. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. **NO Não observado o crescimento bacteriano.

Não houve correlação entre os isolamentos por trituração e por separação de cotilédones, onde o valor de R^2 foi de 0,26. Isso demonstra que os métodos de isolamento empregados obtiveram resultados divergentes, o que pode levar a uma discussão sobre mecanismos de seleção que podem ocorrer pelo uso de diferentes métodos de isolamento, visto que se esperava uma correlação significativa entre os dois isolamentos. As frequências de sementes possivelmente sem bactérias cultiváveis nas condições comparadas foram calculadas para os dois métodos utilizados, baseadas no número de placas onde nenhuma colônia foi observada. Pelo método de trituração, essa frequência foi de 50%, enquanto que para o método de separação dos cotilédones a frequência foi de 72%. A maior frequência de sementes sem bactérias cultiváveis no isolamento de separação de cotilédones pode ser explicada pelo fato do tecido ser exposto durante a trituração, facilitando o isolamento das bactérias das sementes. Além disso, no isolamento por trituração, foram utilizadas cerca de 50 sementes juntas, e a presença de uma única semente com uma alta densidade bacteriana pode ter “contaminado” todas as outras. No isolamento por separação de cotilédones as sementes não tiveram contato entre si, portanto a frequência de sementes sem bactérias cultiváveis aproxima-se do valor real. Pelo fato da densidade bacteriana não ser constante no método de separação de cotilédones, sugere-se que a transferência de bactérias em sementes de soja seja predominantemente horizontal, onde as sementes seriam eventualmente “contaminadas” durante o manuseio ou por meio de estômatos, pequenos ferimentos, zona de emissão de raízes e injúrias causadas por práticas agrícolas. Já o método de trituração foi mais eficiente para isolar um maior número de bactérias e uma maior diversidade bacteriana.

O presente trabalho isolou bactérias endofíticas de sementes de soja de diferentes cultivares, convencionais e geneticamente modificados, permitindo a determinação de grupos bacterianos cultiváveis. Os isolamentos realizados permitiram observar que a densidade bacteriana em sementes de soja é relativamente baixa (média de $0,59 \times 10^2$) e que não se mantém constante, variando entre sementes da mesma cultivar. Comparando os dados de densidade bacteriana obtidos com os de KUKLINSKY-SOBRAI (2003), que isolou bactérias endofíticas de outros tecidos de soja, observa-se que esses valores em sementes apresentaram-se inferiores, comparados aos de outros tecidos de soja. Ferreira et al. (2008) sugerem a transferência vertical de bactérias endofíticas em sementes de eucalipto, uma vez que a comunidade bacteriana de mantém estável em plantas. Segundo Azevedo; Araújo (2007), embora microrganismos endofíticos sejam isolados de sementes de algumas espécies de plantas, geralmente não são transmitidas verticalmente por

meio de sementes e, sim, horizontalmente, por meio de aberturas naturais ou artificiais. Depois da penetração, esses microrganismos colonizam o hospedeiro, sendo encontrados em todos os órgãos e tecidos, inclusive o interior de células.

O método de trituração permitiu o isolamento de um maior número de colônias bacterianas e de um maior número de gêneros, enquanto que o método de separação de cotilédones permitiu determinar o índice de sementes sem bactérias cultiváveis nas condições comparadas, uma vez que neste método as sementes não entram em contato, impedindo que bactérias de uma semente contaminem outra.

2.3.2 Origem dos isolados identificados

Dentre os isolados identificados, 22 (35,5%) foram isolados do primeiro isolamento (trituração), 6 (9,7%) do segundo (separação de cotilédones) e 34 (54,8%) do terceiro isolamento (trituração). Dos 62 isolados identificados, 23 (37%) são oriundos de plantas geneticamente modificadas e 39 (63%) de plantas convencionais.

Alguns gêneros bacterianos foram isolados tanto de plantas convencionais quanto das geneticamente modificadas. São eles: *Microbacterium*, *Bacillus*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus* e *Methylobacterium* enquanto que outros foram exclusivos de plantas geneticamente modificadas (*Tsukamurella*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Chryseobacterium* e *Micromonospora*) ou de plantas convencionais (*Pantoea* e *Acinetobacter*). O gênero mais frequentemente isolado (*Acinetobacter*) esteve presente somente em sementes de plantas convencionais. A Tabela 4 mostra o número de isolados de cada cultivar de soja e a identificação dos isolados.

Tabela 4 - Identificação (gênero), distribuição e frequência dos gêneros de bactérias endofíticas de sementes de soja geneticamente modificada e convencional

Gêneros	Tratamentos					
	T(n°) *	T (%)	C(n°) **	C (%)	Total (n°)	Total (%)
<i>Tsukamurella</i>	1	1,61	0	0,00	1	1,61
<i>Brevibacterium</i>	1	1,61	0	0,00	1	1,61
<i>Pseudomonas</i>	3	4,84	0	0,00	3	4,84
<i>Curtobacterium</i>	1	1,61	0	0,00	1	1,61
<i>Microbacterium</i>	2	3,23	1	1,61	3	4,84
<i>Pantoea</i>	0	0,00	1	1,61	1	1,61
<i>Acinetobacter</i>	0	0,00	21	33,87	21	33,87
<i>Citrobacter</i>	1	1,61	0	0,00	1	1,61
<i>Bacillus</i>	5	8,06	6	9,68	11	17,74
<i>Ochrobactrum</i>	1	1,61	3	4,84	4	6,45
<i>Paenibacillus</i>	1	1,61	3	4,84	4	6,45
<i>Enterobacter</i>	2	3,23	0	0,00	2	3,23
<i>Streptomyces</i>	1	1,61	0	0,00	1	1,61
<i>Methylobacterium</i>	2	3,23	4	6,45	6	9,68
<i>Chryseobacterium</i>	1	1,61	0	0,00	1	1,61
<i>Micromonospora</i>	1	1,61	0	0,00	1	1,61
Total de isolados por tratamento	23	37,10	39	62,90	62	100

*T = Semente geneticamente modificada (transgênica); **C = Semente convencional

2.3.3 ARDRA, sequenciamento parcial da região 16S rDNA e classificação filogenética dos isolados bacterianos

De 3504 isolados obtidos nos três isolamentos, 406 foram selecionados e estocados. Estes foram agrupados morfológicamente baseados em cor, forma e tamanho das colônias em 17 grupos, e destes, 176 foram escolhidos, ao acaso, para a análise de ARDRA.

Para avaliar a diversidade genética de parte dos isolados bacterianos, foi utilizada a técnica de ARDRA, sendo avaliadas duas enzimas, *MboI* e *HhaI*. As clivagens das PCRs 16S rDNA, com a enzima *MboI*, apresentaram um maior número de perfis de restrição, demonstrando ser mais eficientes para discriminar as bactérias em diferentes perfis de restrição. Sendo assim, as análises obtidas com a enzima *HhaI* foram desconsideradas. Os produtos de PCR da região 16S rDNA de 1400 pb foram clivados com a enzima *MboI*, gerando fragmentos de pouco menos de 1400 pb até fragmentos com menos de 250 pb, todos considerados para a análise. Dos 176 isolados analisados, 12 perfis de restrição foram obtidos, agrupando os isolados de acordo com os perfis de bandas. Foi possível observar de um a cinco fragmentos em cada um dos 12 perfis de restrição gerados (Figura 1). Isolados pertencentes a cada ribotipo foram selecionados aleatoriamente para serem identificados e serem submetidos aos experimentos que se seguem. A Figura 1 mostra os 12 ribotipos obtidos em gel de agarose pela digestão da PCR 16S rDNA com a enzima de restrição *MboI*.

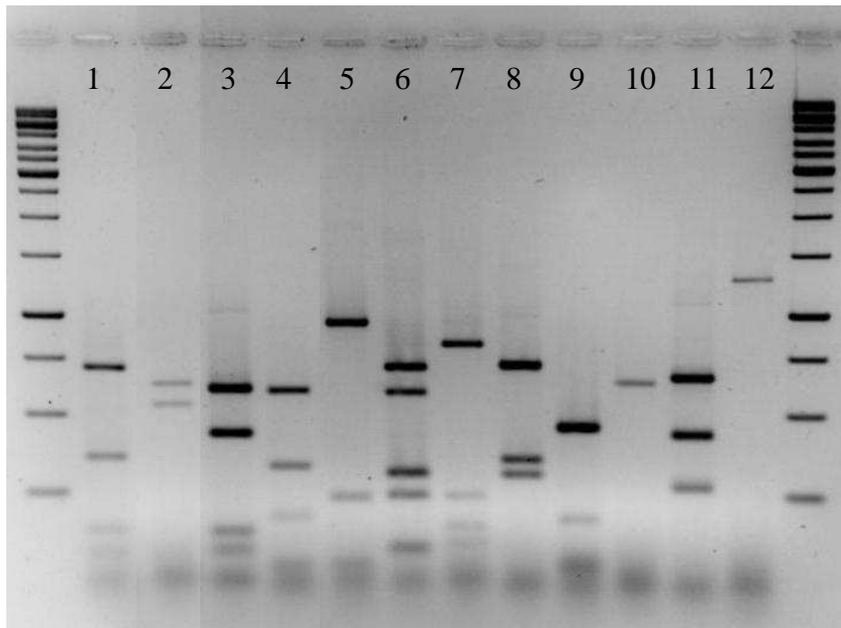


Figura 1 – Gel de agarose com os perfis de bandas dos grupos obtidos pela digestão da PCR 16S rDNA com a enzima de restrição *MboI*. Cada canaleta representa um ribotipo. M = marcador molecular de 1Kb

De 3504 isolados obtidos, os 62 (15%) foram classificados filogeneticamente. Um fragmento de aproximadamente 500 pb do gene 16S rDNA de cada isolado foi sequenciado e a classificação filogenética foi obtida mediante comparação com sequências originadas de linhagens

tipos, presentes no banco de dados do RDPQuery, por meio do *software* RDPQuery (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm) (Anexo A). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com sequências originadas de linhagens tipos e consideradas as sequências com os maiores valores de similaridade, que variaram de 97% a 100% (Anexo A). O sequenciamento parcial da região 16S rDNA permitiu acessar parte da diversidade bacteriana endofítica cultivável de sementes de soja. Os critérios utilizados para selecionar os isolados para serem identificados foram morfológicos e baseados na análise de ARDRA. Embora a distinção morfológica utilizada não seja a técnica mais adequada para a seleção de isolados, associada à técnica de ARDRA permitiu a identificação de 16 gêneros diferentes (Tabela 5).

Após a identificação dos gêneros bacterianos realizada por meio do sequenciamento parcial da região 16S rDNA, observou-se que nem todos os perfis foram constituídos de um único gênero bacteriano, assim como foi observado que o gênero *Bacillus* esteve presente em mais de um perfil. O ribotipo 5 (Figura 1) foi o mais frequente, representado pelos gêneros *Acinetobacter* e *Methylobacterium*, seguido do ribotipo 2 (Figura 1), representado pelos gêneros *Ochrobactrum*, *Microbacterium* e *Brevibacterium*. A Tabela 5 mostra a distribuição e a frequência das Famílias nos ribotipos obtidos por ARDRA.

Tabela 5 – Distribuição e frequência das Famílias nos ribotipos obtidos por ARDRA

(continua)

Perfil de ARDRA	Famílias	Gêneros	Isolados incluídos nos perfis (%)
1	Tsukamurellaceae	<i>Tsukamurella</i>	1
2	Brucellaceae, Microbacteriaceae e Micrococcineae	<i>Ochrobactrum</i> , <i>Microbacterium</i> e <i>Brevibacterium</i>	16
3	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i>	2
4	Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	2
5	Moraxellaceae e Methylobacteriaceae	<i>Acinetobacter</i> e <i>Methylobacterium</i>	35
6	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i> e <i>Citrobacter</i>	6

Tabela 5 – Distribuição e frequência das Famílias nos ribotipos obtidos por ARDRA

Perfil de ARDRA	Famílias	Gêneros	Isolados incluídos nos perfis (%)
7	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	6
8	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	12
9	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	10
10	Pseudomonadaceae e	<i>Pseudomonas</i> e	7
	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	

Os dados de isolamento bacteriano obtidos estão de acordo com aqueles de KUKLINSKY-SOBRAL et al. (2004), que isolaram de raízes, colmos e folhas de soja algumas bactérias dos mesmos grupos, como Pseudomonadaceae e Enterobacteriaceae. Dentre gêneros descritos por KUKLINSKY-SOBRAL et al. (2004) capazes de promover crescimento em plantas de soja, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Acinetobacter* foram obtidos nos isolamentos. Li et al. (2008) isolaram bactérias endofíticas de nódulos de soja os gêneros *Pantoea*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Agrobacterium* e *Burkholderia*.

Dos isolados identificados, 63% são provenientes de sementes convencionais, enquanto que 37% são provenientes de plantas geneticamente modificadas. A comunidade endofítica de sementes de soja mostrou ser diferente nas plantas amostradas convencionais e geneticamente modificadas. Embora o número de isolados amostrados de plantas geneticamente modificadas tenha sido menor (37%), foi encontrada uma diversidade maior (15 gêneros) comparada à comunidade isolada de plantas convencionais (sete gêneros). Alguns gêneros identificados foram comuns para os dois tratamentos. Com esses resultados não se pode generalizar que exista uma maior diversidade em plantas geneticamente modificadas, uma vez que não se sabe exatamente o local e as condições de cultivo das plantas amostradas. A transgenia pode interferir na comunidade endofítica de uma planta, porém existem muitos outros fatores que influenciam na diversidade da microbiota (ARAÚJO; ROSSETTO; KUKLINSKY-SOBRAL, 2008). Essa observação aplica-se também aos resultados dos experimentos seguintes, onde são mostradas as diferenças de comunidade e de características fenotípicas de isolados oriundos de sementes

transgênicas e convencionais. Na Tabela 6 é mostrada a classificação das sequências parciais do gene 16S rDNA dentro dos tratamentos T e C.

Tabela 6- Classificação das sequências obtidas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos dentro dos tratamentos e valores de cobertura ecológica

Ordem	T*	C**	Família	T	C	Gênero	T	C
Pseudomonadales	3	21	Pseudomonadaceae	3		<i>Pseudomonas</i>	3	
			Moraxellaceae		21	<i>Acinetobacter</i>		21
Bacillales	6	9	Bacillaceae	5	6	<i>Bacillus</i>	5	6
			Paenibacillaceae	1	3	<i>Paenibacillus</i>	1	3
Actinomycetales	7	1	Microbacteriaceae	3	1	<i>Microbacterium</i>	2	1
						<i>Curtobacterium</i>	1	
			Streptomycetaceae	1		<i>Streptomyces</i>	1	
			Micromonosporaceae	1		<i>Micromonospora</i>	1	
			Tsukamurellaceae	1		<i>Tsukamurella</i>	1	
			Micrococcineae	1		<i>Brevibacteriaceae</i>	1	
Rhizobiales	3	7	Brucellaceae	1	3	<i>Ochrobactrum</i>	1	3
			Methylobacteriaceae	2	4	<i>Methylobacterium</i>	2	4
Flavobacteriales	1		Flavobacteriaceae	1		<i>Chryseobacterium</i>	1	
Enterobacteriales	3	1	Enterobacteriaceae	3	1	<i>Pantoea</i>		1
						<i>Enterobacter</i>	2	
						<i>Citrobacter</i>	1	
Total	23	39		23	39		23	39
Cobertura ecológica	0,83	0,60		0,42	0,71		0,36	0,71

*T = Semente geneticamente modificada (transgênica); **C = Semente convencional

Os valores de cobertura ecológica são calculados pela fórmula $C=1-(n/N)$, onde n é o número de grupos representados por apenas um indivíduo, e N o número total de grupos. Esses

valores mostram que, de acordo com a amostragem utilizada, a maior parte das ordens de plantas geneticamente modificadas foi acessada (0,83), assim como as famílias (0,71) e gênero (0,71) de plantas convencionais. Os valores menores (0,60; 0,42 e 0,36) indicam a necessidade de uma amostragem maior para obter uma cobertura ecológica satisfatória para ordem de plantas convencionais e famílias e gêneros de plantas geneticamente modificadas. Os valores de cobertura ecológica calculados demonstram que ainda existe uma diversidade a ser explorada nas amostras, onde a cobertura ecológica foi de 83%, 42% e 36% para ordem, família e gênero, respectivamente de sementes geneticamente modificadas e de 60%, 71% e 71% para ordem, família e gênero, respectivamente de sementes convencionais. Com o intuito de estimar a diversidade endofítica bacteriana de raiz de arroz (*Oryza sativa* L.), Sun et al. (2008) utilizaram técnicas moleculares independentes de cultivo, uma vez que as condições de crescimento das bactérias muitas vezes são desconhecidas. Por meio do sequenciamento de biblioteca do gene 16S rDNA de amostras de raízes da planta, em seu trabalho foi obtida uma cobertura ecológica de 90,6% para espécies. Embora com o uso de técnicas moleculares seja possível acessar uma maior diversidade microbiana, a técnica dependente de cultivo permite o manuseio dos microrganismos para outros fins, como para a sua exploração biotecnológica.

2.3.4 Análise de diversidade e rarefação

Buscou-se amostrar para identificação a maior diversidade possível de bactérias por meio da morfologia (visualmente) e por perfis da técnica de ARDRA. As 62 bactérias selecionadas para identificação representam 1,8% do total de bactérias isoladas (3504). Essas foram identificadas e tiveram parte da região 16S rDNA analisadas pelos teste de rarefação por meio do *software* DOTUR, estimando os índices de diversidade (Shannon-Weaver) (HILL et al., 2003) e de riqueza de espécies (Chao1) (CHAO; LEE, 1992). O índice de Shannon-Weaver (H') é o mais comumente utilizado para calcular a diversidade de amostras ambientais (HILL et al., 2003).

A diversidade e a estrutura de comunidades microbianas variam com o tamanho da amostra, pois, quanto maior o tamanho da amostra, maior é a probabilidade de serem amostradas espécies raras. Portanto, não é possível comparar a diversidade apenas contando o número de espécies; é levada em consideração a ocorrência de unidades taxonômicas operacionais (UTOs),

que podem ser representadas por sequências de rDNA 16S (BOND et al., 1995). Ainda, a contribuição de cada espécie varia para o cálculo da diversidade, uma vez que seus papéis funcionais são diferentes na comunidade. Para o cálculo do índice de diversidade (Tabela 7), a abundância relativa de cada espécie tem peso estatístico diferente. Espécies raras têm menor peso no cálculo comparado às espécies comuns, contribuindo menos para o valor do índice de diversidade. A estimativa do número de espécies de uma determinada amostra varia na proporção direta do número de indivíduos amostrados. Para a comparação de amostras de números diferentes de indivíduos, é aplicado o procedimento estatístico chamado de rarefação. A análise de rarefação relaciona o número de espécies (diversidade) e o tamanho da amostra. Assim, no geral amostras maiores dão origem a amostras totais maiores (RICKLEFS, 1996). Foi realizada a análise de rarefação para o grupo total de sequências, mostrando não haver saturação do número de sequências analisadas (Figura 2). Pelo fato da amostragem restrita, comparada à diversidade presente em sementes, não se pode inferir que isolados provenientes de plantas convencionais ou de geneticamente modificadas são mais ou menos eficientes para qualquer uma das características fenotípicas avaliadas neste estudo. As diferenças de comunidades são pertinentes apenas às sementes estudadas, portanto essas características não podem ser generalizadas para outros estudos do gênero.

Tabela 7 – Índices de diversidade e riqueza obtidos a partir da análise das sequências parciais do gene 16S rDNA dos isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja

	Diversidade (Shannon-Weaver)	Riqueza (Chao1)
Únicas	3,68 (\pm 0,19)	91 (63-160)
99%	3,05 (\pm 0,27)	52 (38-96)
97%	2,71 (\pm 0,28)	44 (29-97)
95%	2,27 (\pm 0,28)	31 (20-84)

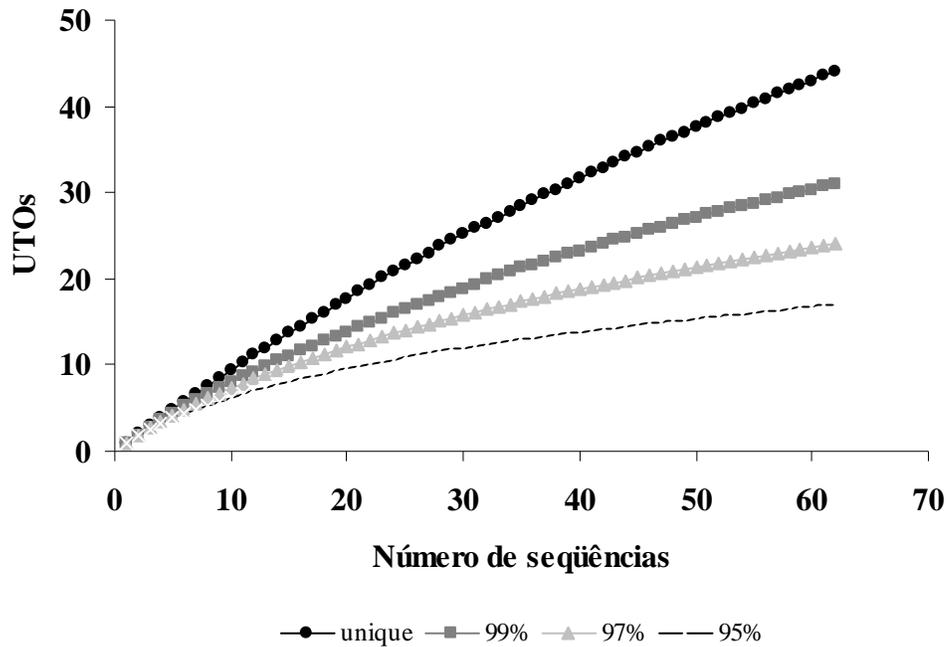


Figura 2 – Análise de rarefação das seqüências analisadas: diferentes níveis de similaridade para a determinação das UTOs (únicas, 99%, 97% e 95%)

A curva de rarefação, quando tende a um plateau, indica que a amostragem foi suficiente para acessar a comunidade estudada. Porém, no trabalho de Sun et al. (2008), esta curva tende a crescer, indicando que a comunidade foi pouco acessada e que há uma enorme diversidade a ser explorada. As análises foram baseadas nas seqüências parciais do gene 16S rDNA, obtidas a partir de 62 isolados bacterianos de sementes de soja. A estimativa do número possível de UTOs (Riqueza de espécies Chao I) para a comunidade bacteriana avaliada revela valores maiores aos obtidos por isolamento. Isso se justifica, principalmente devido à utilização de um único método para o isolamento das bactérias e talvez ao critério de seleção (morfologia de colônias) de isolados adotado para a identificação. O fato de ter sido utilizado apenas um meio de cultura associado a uma temperatura de incubação pode ter sido limitante para o crescimento de bactérias fastidiosas e não cultiváveis.

Vale ressaltar que os índices de diversidade variam em função do tamanho da amostra, onde as espécies raras têm peso diferente das espécies mais frequentes para o cálculo. A presença de bactérias não cultiváveis em sementes de soja pode ser acessada por técnicas de biologia molecular, possibilitando calcular mais precisamente os valores de cobertura ecológica e os

índices de diversidade e riqueza. Por outro lado, para experimentos de promoção de crescimento é necessário isolar as bactérias.

2.3.5 Análises funcionais das bactérias isoladas de sementes de soja

Uma vez que a amostragem de isolados bacterianos tenha sido realizada buscando a maior diversidade possível, não foi selecionado o mesmo número de isolados de cada tratamento (cultivares cv 1 à cv 12). Portanto, para evitar possíveis erros de análise estatística, os tratamentos (cultivares) de sementes foram agrupados em dois grupos para aumentar o número de representantes de cada tratamento nos ensaios de antagonismo, produção de AIA, solubilização de fosfato, fixação de N₂ e promoção de crescimento em casa de vegetação. Os tratamentos são: plantas geneticamente modificadas (transgênicas) ou T, que inclui os tratamentos cv 1 a cv 6; e convencionais ou C, que inclui os tratamentos cv 7 a cv 12. O tratamento T é representado por 23 isolados e o tratamento C por 39.

2.3.6 Ensaio de antagonismo

Dentre os 62 isolados bacterianos avaliados contra 6 fungos fitopatogênicos, 11 apresentaram ter algum tipo de ação de controle sobre, pelo menos, um dos fungos, equivalente a 18%. Os resultados das interações entre as bactérias e os fungos são apresentados na Tabela 8. Algumas das bactérias tiveram ação sobre mais de um dos fungos avaliados. Dois isolados, ambos do gênero *Ochrobactrum*, apresentaram ter ação sobre mais de um dos fungos avaliados. O isolado 54D(42) de *Ochrobactrum* sp., teve ação sobre 4 dos 6 fungos avaliados e o isolado 53B (59) do mesmo gênero teve ação sobre 3 deles. Dois isolados do gênero *Bacillus* mostraram ter efeito antagonista contra *Fusarium oxysporum*, com diferentes tipos de interação (Tabela 8). Cazorla et al. (2007) isolaram do rizoplano de abacate, *Rosellinia necatrix*, bactérias identificadas como *Bacillus* sp. e as caracterizaram como antagonistas a patógenos de plantas, entre eles *Fusarium oxysporum*. Melo (1995) descreve a capacidade de isolados de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus subtilis* em controlar *Fusarium solani*. Dos isolados bacterianos que apresentaram algum tipo de

interação com os fungos, 4 (36%) são provenientes de plantas geneticamente modificadas e 7 (64%) de plantas convencionais. Os isolados não citados na Tabela 8 não demonstraram qualquer ação sobre os fungos (classificados como SI ou sem inibição). A presença de bactérias que não formaram halo de inibição contra os fungos fitopatogênicos sugere a produção de compostos voláteis, uma vez que diminuíram radialmente a colônia fúngica, ou mesmo modificaram as características morfológicas. Embora seja dada mais atenção para antagonistas produtores de halo de inibição em cultura pareada, sabe-se que algumas bactérias produzem compostos voláteis, com ação inibitória de fungos e não compostos difundidos pelo ágar do meio de cultura. Fernando et al. (2005) identificaram seis compostos voláteis de *Pseudomonas* spp. inibidores do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. O gênero *Acinetobacter* também é conhecido por ter propriedades antifúngicas. Liu et al. (2007) descrevem isolados de *Acinetobacter* como antagonistas de diversos fungos fitopatogênicos, entre eles *Phytophthora*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*.

Tabela 8 - Tipos de interação entre os isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja e fungos fitopatogênicos

(continua)

Isolados	Gêneros bacterianos	Tratamentos	Fungos	Tipo de interação*
11B (2)	<i>Brevibacterium</i>	T	<i>C. kikuchii</i> (soja)	HI
3C (6)	<i>Microbacterium</i>	T	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	BE
80A (13)	<i>Acinetobacter</i>	C	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	AF + BE
43A (25)	<i>Bacillus</i>	T	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	AF
91A (29)	<i>Acinetobacter</i>	C	<i>C. kikuchii</i> (soja)	AF
54D (42)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>F. semitectum</i> (soja)	AF
54D (42)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>F. oxysporum</i> (feijão)	AF
54D (42)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>C. kikuchii</i> (soja)	AF
54D (42)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	AF+ BE
129B (46)	<i>Acinetobacter</i>	C	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	AF + BE
41B (52)	<i>Bacillus</i>	C	<i>F.oxysporum</i> (algodão)	BE

Tabela 8 - Tipos de interação entre os isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja e fungos fitopatogênicos

(conclusão)				
Isolados	Gêneros bacterianos	Tratamentos	Fungos	Tipo de interação*
4E (7)	<i>Microbacterium</i>	T	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	BE
56B (44)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	BE
53B (59)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>F. oxysporum</i> (feijão)	AF
53B (59)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>C. kikuchii</i> (soja)	AF
53B (59)	<i>Ochrobactrum</i>	C	<i>F. oxysporum</i> (algodão)	AF+ BE

HI: com halo de inibição; AF: com ação fungistática; BE: com baixa esporulação.

2.3.7 Bactérias produtoras de ácido-indol-acético (AIA), solubilizadoras de fosfato e fixadoras de nitrogênio

A avaliação do experimento revelou que todos os isolados avaliados foram capazes de produzir alguma quantidade de AIA (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cultura), sendo 14 os maiores produtores de AIA. Os valores de produção de AIA variaram de $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $34,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 9). Dentre eles, 7 isolados (ou 50%) são provenientes de plantas geneticamente modificadas e 7 isolados (ou 50%) de plantas convencionais. Alguns gêneros tiveram todos os isolados produtores de AIA, como por exemplo, o gênero *Ochrobactrum*, enquanto que outros gêneros tiveram isolados com alta ou baixa produção, como é o caso do gênero *Acinetobacter* (Tabela 9). Tsavkelova et al. (2007) relatam variações na biossíntese de AIA por linhagens do mesmo gêneros bacterianos. Kuss et al. (2007) obtiveram valores de produção de AIA, por bactérias diazotróficas endofíticas (*Azospirillum spp.*), variando entre $2,79$ e $13,47 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando quantificado em meio de cultura. Crozier et al. (1988) quantificaram a produção de AIA também de *Azospirillum sp.* isolados de milho, obtendo valores entre $1,4$ e $26,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Selvakumar et al. (2008) isolaram *Bacillus* e *Enterobacter* de nódulos de kudzu (*Pueraria thunbergiana*) capazes de produzir AIA na concentração de $6,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses mesmos isolados foram capazes de promover o crescimento

de plântulas de trigo por meio do aumento do comprimento e da biomassa da raiz e plântulas. Foi relatado o aumento do desenvolvimento do sistema radicular como consequência da inoculação de isolados de *Pseudomonas* produtoras de AIA em plantas (PATTEN; GLICK, 2002b). Teixeira et al. (2007) isolaram de mandioca (*Manihot esculenta*) bactérias endofíticas dos subgrupos γ -Proteobacteria, Bacilli e Actinobacteria produtoras de AIA.

Porém, a produção de AIA pode ser dependente de triptofano, que pode ser limitado em condições naturais. A habilidade de sintetizar AIA, na presença e na ausência de triptofano, aumenta o potencial de eficácia do microrganismo em condições de campo (SERGEEVA; HIRKALA; NELSON, 2007).

Tabela 9 – Identificação, tratamento, produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja. Os dados foram originados de três repetições e valores da mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

(continua)						
Isolado	Identificação	Tratamento**	AIA ($\mu\text{.mL}^{-1}$)	Halo de solubilização de fosfato (cm)	Fixação de N ₂	
1D (1)	<i>Tsukamurella</i> sp.	T	5,2 i	0,0 g	-	
11B (2)	<i>Brevibacterium</i> sp.	T	2,6 i	0,0 g	-	
16A (3)*	<i>Pseudomonas</i> sp.	T	8,9 ih	6,2 b	-	
10A (4)	<i>Curtobacterium</i> sp.	T	4,7 i	0,5 fg	-	
31D (5)	<i>Microbacterium</i> sp.	C	4,5 i	0,0 g	-	
3C (6)	<i>Microbacterium</i> sp.	T	3,0 i	0,0 g	-	
4E (7)	<i>Microbacterium</i> sp.	T	3,5 i	0,0 g	-	
33B (8)*	<i>Pantoea</i> sp.	C	34,9 a	6,0 b	-	
13C (9)*	<i>Methylobacterium</i> sp.	T	3,5 i	2,2 def	+	
14A (10)	<i>Methylobacterium</i> sp.	T	3,3 i	0,0 g	-	
36B (11)	<i>Methylobacterium</i> sp.	C	2,9 i	0,0 g	-	
38D (12)*	<i>Methylobacterium</i> sp.	C	3,9 i	0,0 g	+	
80A (13)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	2,6 i	0,8 efg	-	
98A (14)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,5 i	0,0 g	-	
115B (15)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	2,9 i	0,0 g	-	
85A (16)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,9 i	0,0 g	-	

Tabela 9 – Identificação, tratamento, produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja. Os dados foram originados de três repetições e valores da mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

(continuação)

Isolado	Identificação	Tratamento**	AIA ($\mu\text{.mL}^{-1}$)	Halo de solubilização de fosfato (cm)	Fixação de N_2
100A (17)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,8 i	0,0 g	-
101A (18)*	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	2,8 i	0,0 g	+
108E (19)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	2,8 i	0,0 g	-
97A (20)*	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	5,7 i	6,0 b	+
26C (21)*	<i>Enterobacter</i> sp.	T	23,2 def	5,3 bc	-
62A (22)*	<i>Citrobacter</i> sp.	T	16,7 fg	4,7 bc	+
110A (23)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,8 i	0,2 g	-
43A (25)	<i>Bacillus</i> sp.	T	3,7 i	0,0 g	-
68G (26)*	<i>Methylobacterium</i> sp.	C	4,0 i	0,0 g	+
68I (27)	<i>Methylobacterium</i> sp.	C	3,4 i	0,0 g	-
78A (28)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	5,0 i	0,0 g	-
91A (29)*	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	27,4 abcd	1,3 efg	+
110B (30)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	2,8 i	0,0 g	-
131A (31)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,3 i	0,0 g	-
118B (32)*	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,8 i	0,0 g	+
59A (33)*	<i>Pseudomonas</i> sp.	T	20,1 defg	3,7 cd	+
42A (34)	<i>Bacillus</i> sp.	C	3,0 i	0,0 g	-
121B (35)	<i>Bacillus</i> sp.	C	2,9 i	0,0 g	-
6A (36)	<i>Bacillus</i> sp.	T	5,8 i	2,5 de	-
15C (37)*	<i>Pseudomonas</i> sp.	T	6,6 i	6,5 ab	-
24E (38)*	<i>Ochrobactrum</i> sp.	T	23,9 cdef	0,5 fg	-
47A (39)	<i>Bacillus</i> sp.	T	2,6 i	0,0 g	-
73B (40)	<i>Bacillus</i> sp.	C	2,9 i	0,0 g	-
107A (41)	<i>Bacillus</i> sp.	C	6,5 i	1,0 efg	-
54D (42)	<i>Ochrobactrum</i> sp.	C	23,0 def	0,5 fg	-

Tabela 9 – Identificação, tratamento, produção de AIA, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio pelos isolados bacterianos endofíticos de sementes de soja. Os dados foram originados de três repetições e valores da mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

(conclusão)

Isolado	Identificação	Tratamento**	AIA ($\mu\text{.mL}^{-1}$)	Halo de solubilização de fosfato (cm)	Fixação de N ₂
27E (43)	<i>Chryseobacterium</i> sp.	T	18,9 efg	0,0 g	-
56B (44)*	<i>Ochrobactrum</i> sp.	C	25,6 bcde	0,3 fg	-
64E (45)	<i>Paenibacillus</i> sp.	T	2,6 i	0,0 g	-
129B (46)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	15,0 gh	0,0 g	-
70A (47)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	8,4 ih	0,6 efg	-
69B (48)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	2,7 i	0,0 g	-
124D (49)	<i>Paenibacillus</i> sp.	C	3,5 i	0,0 g	-
125E (50)	<i>Paenibacillus</i> sp.	C	3,3 i	0,0 g	-
35A (51)	<i>Paenibacillus</i> sp.	C	2,5 i	0,0 g	-
41B (52)	<i>Bacillus</i> sp.	C	3,4 i	0,0 g	-
106B (53)	<i>Bacillus</i> sp.	C	5,7 i	1,0 efg	-
61A (54)*	<i>Bacillus</i> sp.	T	4,4 i	0,0 g	+
71A (55)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	5,8 i	0,3 fg	-
82A (56)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,4 i	0,0 g	-
67A (57)*	<i>Enterobacter</i> sp.	T	31,7 ab	8,3 a	+
46A (58)	<i>Bacillus</i> sp.	T	3,2 i	0,0 g	-
53B (59)	<i>Ochrobactrum</i> sp.	C	22,1 defg	0,5 fg	-
129D (60)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,5 i	4,0 cd	-
122D (61)	<i>Acinetobacter</i> sp.	C	3,8 i	0,2 g	-
19A (62)	<i>Streptomyces</i> sp.	T	2,9 i	0,0 g	-
22A (63)	<i>Micromonospora</i> sp.	T	3,9 i	0,0 g	-
dH5a	<i>Escherichia coli</i>		31,0 abc		

* isolados bacterianos selecionados para o ensaio de promoção de crescimento de plantas de soja em casa de vegetação **T = Semente geneticamente modificada (transgênica); C = Semente concencional; + = Isolados fixadores de nitrogênio *in vitro*; - = Isolados não fixadores de nitrogênio *in vitro*;

Os mesmos isolados foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro* (Tabela 9). A presença de um halo em torno da colônia bacteriana indicou a capacidade da bactéria de solubilizar fosfato. Das 62 bactérias avaliadas, 24 (39%) foram capazes de formar halo, porém somente 11 isolados (18%) tiveram halo suficientemente grande para diferir estatisticamente daqueles que não produziram halo. O melhor índice de solubilização de fosfato foi observado para o isolado 67A(57) de *Enterobacter* sp., com halo de 8,3cm, e o menor índice foi observado no isolado 122D(61) de *Acinetobacter* sp. (Tabela 9). Apesar deste isolado formar um halo de 0,2cm, este valor não difere estatisticamente de zero, segundo a análise estatística. Houve diferença significativa de frequência de isolados capazes de solubilizar fosfato de plantas geneticamente modificadas e convencionais. Dentre os 11 maiores solubilizadores de fosfato, 8 são provenientes de plantas geneticamente modificadas (frequência de 73%) e 3 de plantas convencionais (frequência de 27%). A média dos tamanhos dos halos dos maiores solubilizadores de fosfato de plantas geneticamente modificadas foi de 4,92 cm, enquanto que a média dos isolados de plantas convencionais é de 5,33 cm. A média dos tamanhos dos halos dos dois tratamentos é de 5,03cm. Forchetti et al. (2007) isolaram *Bacillus* sp. endofíticos de girassol (*Helianthus annuus*) solubilizadores de fosfato. Já Pandey et al. (2006) descrevem um isolado de *Pseudomonas putida* solubilizador de fosfato e comprovam a sua capacidade de promoção de crescimento em milho em condições de casa de vegetação. O fósforo desempenha na planta um papel estrutural e funcional, sendo imprescindível na transferência de energia, fundamental para o desenvolvimento da planta (GONÇALVES et al., 2000). A solubilização de fosfato por bactérias é um mecanismo direto de promoção de crescimento de planta (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999), sendo esta uma das medidas utilizadas para evitar a deficiência nutricional de fósforo em plantas. Diversos gêneros bacterianos têm sido descritos como solubilizadores de fosfato, entre eles *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Os isolados foram submetidos ao ensaio de fixação de nitrogênio, onde as bactérias capazes de crescer e formar uma película (halo) no meio de cultura NFb foram capazes de fixar nitrogênio (Tabela 9) (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Dos 62 isolados bacterianos avaliados, 11 (18%) foram capazes de fixar nitrogênio. Os gêneros positivos para o ensaio foram *Pseudomonas* (1 isolados), *Acinetobacter* (4 isolados), *Citrobacter* (1 isolado), *Bacillus* (1 isolado), *Enterobacter* (1 isolado) e *Methylobacterium* (3 isolados) (Tabela 9). Seis de

11 isolados (54,5%) fixadores de nitrogênio são provenientes de plantas geneticamente modificadas, enquanto que cinco de 11 (45,5%) são isolados de plantas convencionais. Li et al. (2007) descrevem isolados bacterianos de nódulos de soja produtores de AIA, solubilizadores de fosfato e fixadores de nitrogênio, e ainda sugerem ter potencial para a promoção de crescimento de plantas. Teixeira et al. (2007) descrevem bactérias endofíticas de mandioca com capacidade de fixar nitrogênio, inclusive *Pseudomonas*.

Além de determinar a densidade bacteriana e a classificação taxonômica, foi possível avaliar o potencial biotecnológico de aplicação dos isolados para o crescimento de plantas. Os diferentes isolados de plantas geneticamente modificadas (tratamento T) e convencionais (tratamento C) apresentaram características divergentes quanto à capacidade de solubilizar fosfato, sintetizar AIA, fixar nitrogênio e controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos. Dos 62 isolados avaliados, 11 (18%) foram positivos para a fixação de nitrogênio, 14 (23%) melhores para a produção de AIA, 11 (18%) melhores para a solubilização de fosfato e 11 (18%) para o antagonismo contra fungos fitopatogênicos. Embora os números tenham sido próximos ou iguais entre os testes, não necessariamente os mesmos isolados foram positivos para todos os ensaios. Com as avaliações fisiológicas, foi observado que os isolados utilizados têm potencial para a promoção de crescimento vegetal. Diversos trabalhos vêm descrevendo o uso de bactérias endofíticas produtoras de auxinas na promoção de crescimento de plantas. Sergeeva et al. (2007) descreveram a produção de AIA por *Pantoea agglomerans* spp. isoladas da rizosfera de plantas leguminosas e a habilidade de promoção de crescimento por meio do aumento significativo do comprimento e da massa da matéria fresca do tecido radicular de canola. Asghar et al. (2002) relataram a promoção de crescimento *in vitro* de *Brassica* sp. por diversas rizobactérias produtoras de auxinas inoculadas em sementes.

2.3.8 Índice de emergência de plântulas

Foi avaliado o índice de emergência das plântulas após seis e 12 dias da semeadura. Houve uma diminuição de 33% na taxa de emergência das plântulas do tratamento 19 (controle não inoculado: sementes tratadas com assepsia superficial e PBS, sem bactérias) em relação ao tratamento 20 (testemunha), onde 100% das plântulas emergiram. Esse dado indica que o

tratamento de assepsia superficial das sementes, associado à agitação em tampão PBS (*phosphate buffered solution*), afetou a emergência. O método utilizado não é ideal para a inoculação de bactérias em sementes de soja, podendo-se empenhar esforços para aperfeiçoar o processo de inoculação de bactérias em sementes de soja. Na última avaliação de emergência (12 dias depois da semeadura), a porcentagem de emergência dos tratamentos em relação à testemunha (tratamento 20) aumentou de 31% (tratamento 14) a 79% (tratamento 2), indicando que a inoculação das bactérias nas sementes atrasou a emergência. O tratamento 19 (controle) diminuiu a porcentagem de emergência em 35% em relação ao tratamento 20 (testemunha). Observa-se também que a velocidade de emergência dos tratamentos foi afetada, uma vez que o tratamento 20 havia 89% de plântulas emergidas depois de seis dias de semeadura, enquanto que o tratamento 2, por exemplo, havia apenas 48%.

Além de afetar a emergência, o estresse causado pela assepsia e manipulação pode ter interferido na colonização das sementes pelas bactérias. Como salientam Peixoto Neto; Azevedo; Araújo (2002), certas condições ambientais podem fazer com que endofíticos se tornem patógenos, causando danos à planta, já que não existe um limite claro entre eles. Bressan (2003) relatou *Streptomyces* spp. para o controle de fungos em sementes de milho, porém seu uso diminuiu o desenvolvimento da parte aérea e das raízes.

2.3.9 Ensaio de promoção de crescimento de planta *in vivo*

A Tabela 10 mostra os resultados da avaliação do experimento de casa de vegetação. Comparando os efeitos do tratamento 19 (controle não inoculado: sementes tratadas com assepsia superficial e PBS, sem bactérias) em relação ao tratamento 20 (testemunha), observa-se que houve uma tendência da diminuição da massa e da altura das plantas na maioria dos parâmetros avaliados. Conclui-se que a assepsia superficial das sementes inibiu o desenvolvimento das plantas. Uma vez que as sementes de todos os tratamentos foram submetidas à assepsia superficial e à agitação em tampão PBS, os resultados obtidos foram comparados ao tratamento 19 (controle não inoculado).

Depois de aproximadamente 30 dias que o experimento de promoção de crescimento em casa de vegetação havia sido implantado, algumas plantas apresentaram necrose nas bordas das

folhas jovens, um dos sintomas visíveis de deficiência de cobre (MALAVOLTA, 1997). A deficiência de cobre geralmente causa, entre outros sintomas, necrose nas pontas dos folíolos das folhas novas e prossegue pelos bordos dos folíolos, resultando em folhas com aparência de perda de turgidez e de água, aparentando que secaram (BORKERT et al., 1994). A incidência e a severidade dos sintomas foram avaliadas dando as notas “0” para plantas sem sintomas; “1” para plantas com poucos sintomas (com pequenos pontos necrosados ao longo da borda da folha) e “2” para folhas com parte da área foliar necrosada. Segundo a análise estatística não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à deficiência de cobre, portanto não houve correlação entre a deficiência e a inoculação de qualquer uma das bactérias das sementes.

Tabela 10 – Efeito da inoculação de sementes de soja com bactérias endofíticas no desenvolvimento de plântulas aos 35 dias e na ocorrência de deficiência de cobre

Tratamento	Identificação	Isolado	Altura parte aérea (cm)	Massa matéria fresca parte aérea (g)	Massa matéria seca parte aérea (g)	Massa matéria fresca raiz (g)	Massa matéria seca de raiz (g)	Massa matéria fresca tota (g)	Massa matéria seca total (g)	Sintomas (deficiência cobre)								
1	<i>Pseudomonas</i> sp.	16A(3)	15,32	b	1,23	bc	0,26	c	1,69	fg	0,14	bcdefg	2,81	efg	0,41	bc	0,76	a
2	<i>Pantoea</i> sp.	33B(8)	17,07	ab	1,59	ab	0,36	abc	1,95	cdefg	0,17	ab	2,57	bcdef	0,53	ab	0,50	a
3	<i>Acinetobacter</i> sp.	97A(20)	16,93	ab	1,47	abc	0,34	abc	2,41	abcd	0,15	abcdef	3,88	abcde	0,50	ab	0,56	a
4	<i>Citrobacter</i> sp.	62A(22)	17,79	ab	1,62	ab	0,38	a	1,83	defg	0,16	abcd	3,51	bcdefg	0,54	ab	0,89	a
5	<i>Acinetobacter</i> sp.	91A(29)	17,43	ab	1,61	a	0,37	a	2,25	bcdef	0,17	ab	3,85	abcde	0,55	a	0,61	a
6	<i>Pseudomonas</i> sp.	15C(37)	18,50	ab	1,60	ab	0,38	a	2,45	abcd	0,16	abcde	4,14	abc	0,54	ab	0,50	a
7	<i>Ochrobactrum</i> sp.	24E(38)	18,75	a	1,74	a	0,38	a	2,97	a	0,16	abc	4,73	a	0,54	a	0,50	a
8	<i>Enterobacter</i> sp.	67A(57)	17,71	ab	1,61	ab	0,37	ab	2,36	abcde	0,19	a	3,99	abcd	0,56	a	0,72	a
9	<i>Enterobacter</i> sp.	26C(21)	17,43	ab	1,66	a	0,39	a	1,62	fg	0,13	bcdefg	3,28	cdefg	0,52	ab	0,67	a
10	<i>Ochrobactrum</i> sp.	56B(44)	17,33	ab	1,64	ab	0,37	abc	2,39	abcd	0,16	abcdef	3,78	abcde	0,50	ab	0,88	a
11	<i>Pseudomonas</i> sp.	59A(33)	18,07	ab	1,37	abc	0,32	abc	1,65	fg	0,12	defgh	3,18	cdefg	0,44	abc	1,12	a
12	<i>Methylobacterium</i> sp.	68G(26)	17,79	ab	1,61	ab	0,37	a	1,68	efg	0,13	cdefgh	3,32	cdefg	0,50	ab	0,78	a
13	<i>Acinetobacter</i> sp.	101A(18)	17,57	ab	1,60	ab	0,36	abc	1,95	cdefg	0,12	cdefgh	3,48	bcdefg	0,48	abc	0,72	a
14	<i>Acinetobacter</i> sp.	118B(32)	15,50	b	1,16	c	0,27	bc	1,31	g	0,09	h	2,47	g	0,36	c	0,56	a
15	<i>Bacillus</i> sp.	61A(54)	17,86	ab	1,42	abc	0,35	abc	1,33	g	0,11	fgh	2,70	fg	0,44	abc	0,67	a
16	<i>Methylobacterium</i> sp.	13C(9)	16,57	ab	1,43	abc	0,32	abc	1,28	g	0,11	gh	2,70	fg	0,44	abc	0,56	a
17	<i>Methylobacterium</i> sp.	38D(12)	16,04	ab	1,48	abc	0,34	abc	1,48	g	0,12	efgh	2,99	defg	0,45	abc	0,44	a
18 (controle padrão)	<i>P. oryzihabitans</i>	EN 345	16,67	ab	1,53	abc	0,36	abc	2,52	abc	0,15	bcdefg	4,00	abcd	0,50	ab	0,67	a
19 (controle não inoculado)	-	-	15,71	ab	1,48	abc	0,34	abc	2,90	ab	0,15	bcdefg	4,43	ab	0,50	ab	0,71	a
20 (testemunha)	-	-	18,21	ab	1,68	a	0,41	a	2,55	abc	0,16	abcde	4,16	abc	0,56	a	0,89	a
Média			17,21		1,53		0,35		2,03		0,14		3,50		0,49		0,69	
Desvio padrão			1,66		0,20		0,05		0,33		0,02		0,51		0,06		0,22	

Valores da mesma coluna seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

As plantas do experimento de promoção de crescimento apresentaram diferentes respostas em relação aos parâmetros analisados. O experimento apresentou resultados na maioria neutros ou negativos, com exceção do tratamento 8 (Tabela 10). O tratamento 8 (isolado 67A(57) de *Enterobacter* sp.) induziu aumento significativo da massa da matéria seca de raiz em comparação ao tratamento 19 (controle não inoculado) (Tabela 10). Este isolado apresentou *in vitro* uma alta produção de AIA (Tabela 9), o maior halo no meio de cultura de solubilização de fosfato (Tabela 9) e fixação de nitrogênio, além de ser antagonista a fungos fitopatogênicos (Tabela 9). Sugere-se assim, que o aumento da massa da matéria seca da raiz esteja associado à alta produção de AIA pela bactéria, uma vez que células de raiz são mais sensíveis à adição de auxina que células da parte aérea (GLICK, 1995).

Além da maioria dos isolados não promoverem o crescimento (relação neutra), alguns tiveram efeito negativo no desenvolvimento das plantas. As plantas inoculadas com os isolados 61A(54) de *Bacillus* sp., 13C(9) de *Methylobacterium* sp. e 38D(12) de *Methylobacterium* sp. apresentaram diminuição da massa da matéria fresca de raiz e massa da matéria seca total, além de demonstrar uma tendência de diminuição da massa da matéria seca de raiz. Já os resultados da inoculação do isolado 26C(21) de *Enterobacter* sp. mostraram efeito negativo para a massa da matéria fresca de raiz e massa da matéria fresca total, enquanto que houve uma tendência de aumento da massa da matéria (fresca e seca) da parte aérea das plantas. Em contrapartida, o isolado 24E(38) de *Ochrobactrum* sp. apresentou uma tendência de aumento de todos os parâmetros avaliados, embora não diferindo estatisticamente do tratamento 19 (controle não inoculado). Além deste isolado, outros apresentaram uma tendência de aumento de alguns dos parâmetros avaliados (Tabela 10), como é o caso do isolado 15C(37) de *Pseudomonas* sp., onde é observada uma tendência de aumento da massa da matéria seca da parte aérea e e da massa da matéria seca da raiz. Inclusive no controle positivo padrão (tratamento 18, onde sementes foram inoculadas com o isolado EN345 de *Pseudomonas oryzihabitans*) não houve promoção de crescimento, mesmo que o isolado bacteriano tenha sido descrito por Kuklinsky-Sobral (2003) como promotor de crescimento de soja, apresentando um efeito significativo sobre o aumento do peso dos tecidos radiculares e no crescimento da parte aérea de plântulas do cultivar Cristalina, inoculado nas mesmas condições descritas a seguir e avaliadas depois de 17 dias de semeadura. É importante observar que isolados do mesmo gênero apresentaram resultados divergentes quando associados às plantas de soja, como é o caso do gênero *Pseudomonas* com os isolados 16A(3) e

15C(37) e do gênero *Enterobacter*, com os isolados 67A(57) e 26C(21), onde o primeiro apresentou efeito positivo no desenvolvimento da raiz e o segundo efeito negativo no mesmo tecido. Nos experimentos *in vitro* de fixação de nitrogênio, produção de AIA e solubilização de fosfato, o isolado 67A(57) apresentou resultados melhores em relação ao isolado 26C(21), o que ajuda a explicar o seu melhor desempenho em relação à planta. Os resultados obtidos reforçam a idéia de que a promoção de crescimento de plantas é um fenômeno complexo e é alcançado pela atividade simultânea de vários microrganismos (LIFSHITZ et al., 1987). Fica evidente a influência do genótipo da planta na relação planta-bactérias, além de fatores abióticos na promoção de crescimento, uma vez que as condições experimentais utilizadas aproximaram-se das descritas por Kuklinsky-Sobral (2003). Segundo Kuklinsky-Sobral (2003), essas condições permitiram observar a promoção de crescimento de soja por bactérias endofíticas.

O fato de os tratamentos não apresentarem, na sua grande maioria, a promoção de crescimento de plantas pode ser atribuído a diversos fatores como o estresse sofrido pela semente durante a assepsia, a eliminação dos microrganismos epifíticos e a pequenas mudanças no balanço da população bacteriana endofítica, podendo ocasionar um desequilíbrio entre os microrganismos benéficos e deletérios (WHIPPS, 2001). Embora a produção de AIA por bactérias esteja associada à promoção de crescimento de plantas, Liu; Nester (2006) e Patten; Glick (2002b) demonstraram que a sua superprodução por bactérias fitopatogênicas, como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia* ou *Stenotrophomonas*, afeta a planta negativamente, podendo levar ao desenvolvimento de diversas doenças. Mesmo que as bactérias utilizadas no experimento de promoção de crescimento sejam provenientes de sementes, a inoculação bacteriana é um processo artificial. Naturalmente, as bactérias endofíticas têm uma população controlada por diversos fatores, enquanto que na inoculação bacteriana em sementes, milhões de células podem se tornar patogênicas ou saprofíticas, impedindo a germinação ou atrapalhando o desenvolvimento da planta. Embora o efeito benéfico de bactérias promotoras de crescimento seja mais discutido, a ocorrência de efeitos deletérios foi constatada. Probanza (1996) demonstra o efeito negativo de *Bacillus subtilis* no comprimento da parte aérea e raízes de pinus (*Pinus taeda* L.) e de *Pseudomonas fluorescens* sobre o crescimento de amieiro (*Alnus glutinosa*). Santos et al. (2005) observaram o efeito negativo de diferentes espécies de bactérias endofíticas e epifíticas sobre o desenvolvimento de unidades propagativas de helicônia (*Heliconia psittacorum* L.f.).

Para avaliar o potencial de promoção de crescimento de um microrganismo fixador de N₂ e/ou solubilizador de fosfato, o solo ou substrato deve apresentar, preferencialmente, na sua composição, níveis médios para baixos em nitrogênio e/ou fosfato, pois a presença desses nutrientes pode mascarar o efeito benéfico dos microrganismos nas plantas, como é frequentemente relatado no caso das interações *Rhizobium*-Leguminosas ou fungos micorrízicos-plantas. Embora com esta limitação, optou-se por utilizar um substrato rico em matéria orgânica, conseqüentemente rico em nutrientes (inclusive nitrogênio e fosfato) para poder comparar os efeitos dos microrganismos nas plantas com os resultados de Kuklinsky-Sobral (2003). Essas condições permitiram Kuklinsky-Sobral (2003) observar o efeito de promoção de crescimento por bactérias endofíticas em plantas de soja. Segundo Malavolta (1980), a soja possui uma capacidade maior que a de outras culturas para retirar nutrientes do solo; isso explica porque a cultura dispensa a nova adubação em rotação de cultura. Porém, a soja responde positivamente à adubação adequada para leguminosas, além do que, diferentes cultivares respondem diferentemente à adubação ou ao nível de fertilidade do solo. Alguns fatores são considerados como parâmetros de fertilidade do solo: pH, teor P e K disponíveis, cátions trocáveis e teor de matéria orgânica. A calagem, prática que corrige o pH do solo, é considerada como o fator mais importante para a produção da soja em muitos solos, onde o pH na faixa de 6,0 – 6,5 como o mais favorável. O pH inadequado ou o excesso de certos nutriente podem afetar a absorção de outros (MALAVOLTA, 1980). A deficiência ou o excesso de um elemento mineral essencial tem forte influência na atividade de outros elementos e afetará o desenvolvimento da planta. Muitas vezes presente no solo, determinado elemento pode não estar suficientemente disponível para o crescimento da planta, cuja absorção é influenciada por vários fatores como pH, umidade e temperatura (HUBER, 1980). Evitando-se uma perda de área foliar e outros sintomas decorrentes de uma deficiência nutricional (dados não mostrados), optou-se por avaliar o experimento aos 35 dias, mesmo que o ciclo da cultivar Cristalina seja, em média, de 118 dias (ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RIO GRANDE DO SUL - APASSUL, 2008). Previamente ao aparecimento das necroses, esperava-se avaliar o experimento com cerca de 60 dias, tempo necessário para a soja desta cultivar atingisse metade do seu ciclo e cessasse o crescimento vegetativo.

Muitas bactérias isoladas de diferentes ecossistemas mostram ser promotoras de crescimento de plantas e antagonistas contra patógenos de plantas e, portanto têm sido estudados

para o desenvolvimento de produtos comerciais (WELLER et al., 2002). Observou-se, no presente trabalho, a presença de bactérias em sementes soja dos mesmos gêneros de bactérias patogênicas humanas, tais como *Ochrobactrum* (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005), *Tsukamurella* (AUERBACH et al., 1992), *Enterobacter* (STONE et al., 2008), *Pseudomonas* (PEROVIC et al., 2008), entre outros. Muitas dessas mesmas bactérias podem colonizar órgãos e tecido humanos, sendo descritos como oportunistas que causam doenças em pacientes imunodeprimidos (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001) podendo se comportar como patogênicas com a mudança do hospedeiro ou nicho, quando a sua virulência é frequentemente revelada. Esse mecanismo pode ser relevante para patógenos oportunistas (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005). É importante observar que, mesmo com o isolamento de bactérias de possível interesse médico, o processamento da soja para o seu consumo eliminaria essas bactérias, além de estarem presentes em baixas densidades nas plantas. Mesmo assim, o uso de produtos microbiológicos na agricultura implica na aplicação de milhões de células. No presente trabalho, dois isolados do gênero *Ochrobactrum* apresentaram potencial antagonista contra fungos fitopatogênicos. É um gênero descrito como sendo isolado de diferentes habitats (BERG; EBERL; HARTMANN, 2005) e até mesmo de pacientes imunodeprimidos (WI et al., 2007). Portanto, o manuseio e o desenvolvimento de produtos à base de microrganismos devem ser feitos com cautela e rigor. É importante compreender mais detalhadamente a biologia dessas bactérias, principalmente seus mecanismos de patogenicidade, que as permite ocupar diferentes nichos e que possivelmente possam ser responsáveis por causar doenças em humanos (CAO; BALDINI; RAHME, 2001).

3 CONCLUSÕES

1. A comunidade bacteriana endofítica cultivável de sementes de soja foi constituída por 12 ribotipos e 16 gêneros bacterianos. Os gêneros bacterianos presentes foram: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Citrobacter* sp., *Curtobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Methylobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Micromonospora* sp., *Pantoea* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ochrobactrum* sp., *Streptomyces* sp. e *Tsukamurella* sp.
2. O método por trituração foi o melhor para isolamento de bactérias endofíticas de sementes de soja.
3. A comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja geneticamente modificadas analisada apresentou uma diversidade maior comparada à comunidade bacteriana de sementes convencionais.
4. Isolados de *Ochrobactrum* foram os que mais apresentaram potencial de inibição de crescimento ou esporulação de fungos fitopatogênicos: *F. semitectum* (soja), *F. oxysporum* (feijão), *C. kikuchii* (soja), *F. oxysporum* (algodão).
5. Baseado nos ensaios *in vitro*, os isolados avaliados foram capazes de sintetizar AIA, solubilizar fosfato e fixar N₂, mostrando ter potencial biotecnológico e agrícola.
6. O método utilizado na assepsia superficial, associado à agitação em tampão PBS, afetou a germinação das sementes, mostrando não ser adequada para a inoculação de bactérias.
7. O isolado bacteriano 67A(57) de *Enterobacter* sp. foi positivo para a promoção de crescimento de raiz de soja nas condições testadas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, B.R.J.; DODDEY, R.M.; URGUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 1-9, 2003.
- ALVES, S.B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 40, p. 1143-1163
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.
- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI Jr, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; MENDES, R; DINI-ANDREOTE, F; ROSSETTO, P.B.; LABATE, C.A.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; van ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in rizosphere during early plant development. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 93, p. 415-424, 2008.
- ARAÚJO, W.L; ROSSETTO, P.B; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Transferência horizontal de genes de plantas geneticamente modificadas: avaliação dos riscos para as comunidades bacterianas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 2008, cap. 28, p.629-637.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ, 2001. 85 p.
- ASGHAR, H.N; ZAHIR, Z.A.; KHALIQ, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin v. 35, p. 231-237, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. **Dados do complexo soja**. Disponível em <www.abiove.com.br>. Acesso em: 25 ago 2008.
- ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RIO GRANDE DO SUL – APASSUL. **Descrição da cultivar de soja FT- Cristalina RCH**. Disponível em: <<http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=12&a=details&ID=261>>. Acesso em: 03 out. 2008.

AUERBACH, S.B.; MCNEIL, M.M.; BROWN, J.M.; LASKER, B.A.; JARVIS, W.R. Outbreak of Pseudoinfections with *Tsukamurella Paurometabolum* traced to laboratory contamination – efficacy of joint epidemiologic and laboratory investigation. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 14, p. 1015-1022, 1992.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 1998, cap. 2, p. 445-461.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.) **Fungi: multifacetated microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 6, p. 189-207.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA - Meio Ambiente, 2000. cap. 3, p. 57-93.

BALDANI, J.I.; OLIVEIRA, A.L.M.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS JR, F.B.; SILVA, L.G.; REIS V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. v. 38, p. 397–400.

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

BARTEL, B. Auxin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Hamilton, v. 48, p. 51-66, 1997.

BERG, G.; EBERL, L; HARTMANN, A. The rizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p. 1673-1685, 2005.

BONETTI, L.P., Distribuição da soja no mundo. In: MIYASAKA, S., MEDINA, J.C. (Ed) **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1977, p. 1-6.

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

BOND, P.L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L.L. Bacteria community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequencing batch reactors. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1910-1916, 1995.

BORKERT, C.V.; YORINORI, J.T.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; SFREDO, G.J. **Seja o doutor da sua soja**. Piracicaba: POTAFOS, 1994. 6p. (Informações Agronômicas, 66).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Soja Brasil**: série histórica de área cultivada, produção e produtividade. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 25 ago 2008.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: departamento nacional de produção vegetal, 1992. 365p.

BRESSAN, W. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. **BioControl**, Amsterdam, v. 48, p. 233–240, 2003.

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

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

CÂMARA, G.M.S. Origem, difusão geográfica e importância da soja. In: **Soja**: tecnologia da produção. Piracicaba: Publique, 1998. cap. 1, p.1-25.

CAO, H.; BALDINI, R.L.; AND RAHME, L.G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. **Annual Review in Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 259–284, 2001.

CAZORLA, F.M.; ROMERO, D.; PEREZ-GARCIA, A.; LUGTENBERG, B.J.J.; DE VICENTE, A.; BLOEMBERG, G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 103, p. 1950-1959, 2007.

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

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v. 87, p. 252-263, 1992.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb>>. Acesso em: 03 set. 2008.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKAI, E.A. Minireview: Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4951–4959, 2005.

COSTACURTA, A; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, p.1-18, 1995.

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

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

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

DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R; MORA, J; NEWTON, WF. (Ed.) **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 671-676.

EMBRAPA. **Tecnologia de produção de soja para a região central do Brasil 2003: a importância da soja**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/importancia.htm>>. Acesso em: 25 ago 2008.

_____. **Tecnologias de produção de soja: região central do Brasil 2008**. Londrina: Embrapa soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 280p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 12).

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/homepage.do>> Acesso em: 03 set. 2008.

FELIPPE, G.M. **Grãos e sementes - a vida encapsulada**. São Paulo: Editora SENAC, 2007, 430p.

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

FERNANDO, W.G.D.; RAMARATHNAMA, R.; KRISHNAMOORTHY, A.; SAVCHUKA, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Paris, v. 37, p. 955–964, 2005.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in cultura médium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 76, p. 1145-1152, 2007.

GARCÍA, F.P. Fertilización del fresón. In: Subdirección General de 10 Social y Medios **EI fresón. Aspectos técnicos y perspectivas**. Valencia: Caia Rural, 1993. p. 39-57. (Cuadernos de Agricultura, 1).

GEBHARD, F.; NSMALLA, K. Transformation of *Acinetobacter sp.* BD413 by transgenic sugar beet DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1550-1554, 1998.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 20, p. 338-343, 2002.

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

GONÇALVES, J. L. M. et al. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J.L.M; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 310-350.

GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Chicago, v.26, p.192-195, 1950.

GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M; DI SERI, C; FANCELLI, S; FANI, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v. 127, p 85-91, 1995.

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

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

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMULLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indolacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p.916-923, 1983.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 1325-1335, 2002.

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

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

HILL, T.C.J.; WALSH, K.A.; HARRIS, J.A.; MOFFETT, B.F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 1-11, 2003.

HUBER, D.M. The role of mineral nutrition in defense. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. **Plant Pathology: an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1980, v.5, p. 381-406.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnico 13).

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

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA. **Proceedings of the International Seed Testing Association**, Bassersdorf, v.33, n.3, 1968, 554p.

ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London: Chapman & Hall, 1992. 418p.

JAIN, D.K.; PATRIQUIN, D.G. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 206-210, 1985.

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

KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G.W.; WEI, G.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance – historical precedence. **Phytopathology**, Lancaster, v. 87, p. 136-137, 1997.

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

KUKLINSKY-SOBRAL, J.K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófito-planta.** 2003. 189p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, London, v. 8, p. 298-300, 2000.

LATA, H.; LI, X.C.; SILVA, B.; MORAES, R.M.; HALDA-ALIJA, L. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated Echinacea plants using 16S rRNA sequencing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 85, p. 353-359, 2006.

LEWIS, J.A. Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. In: KEISTER, D.L.; CREGAN, P.B. (Ed.) **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991, p. 279–287.

LI, J. H.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 238-246, 2008.

LIFSHITZ, R; KLOEPPER, J.W.; KOZLOWSKI, M; SIMONSON, C; CARLSON, J; TIPPING, EM; ZALESKA, I Growth promotion of canola (rape-seed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 8, p. 102-106, 1987.

LIU, P.; NESTER, E.W. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Stanford, v. 103, p. 4658–4662, 2006.

LIU, C.H.; CHEN, X.; LIU, T.T.; LIAN, B.; GU, Y.; CAER, V.; XUE, Y.R.; WANG, B.T. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 76, p. 459-466, 2007.

LUTZ, M.P.; WENGER, M.; MAURHOFER, M.; DÉFAGO, G; DUFFY, B. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 48, p. 447-455, 2004.

LUZ, W.C. Ecologia da esfermosfera. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998, cap. 6, p. 167-183.

MACHADO, J.C. Tratamento de sementes no controle de doenças. In: _____. **Bases biológicas do tratamento de sementes**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, cap. 2, 2000. p. 3-24.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980, 251p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1997, 319p.

MARCOS FILHO, J. Importância das sementes. In: _____. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 2, p. 27-40.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.I, 1993. p. 369-409.

MELO, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, 1998, v. 1, cap. 1, p. 17-67.

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

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L.C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO A.M. (Ed.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2007. p. 129-140.

MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: _____. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. São Paulo: Ciba Agro, 1991, cap.3, p.115-136.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C.; **A soja no Brasil**. São Paulo: ITAL, 1981. 174p.

MONSANTO. Disponível em: <http://www.monsanto.com.br/sementes/soja_rr/oque/oque.asp>. Acesso em: 03 set. 2008.

MOTAVALLI P. P.; KREMER R. J.; FANG M.; MEANS N. E. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.33, p.816-824, 2004.

MULLER, L. Morfologia, anatomia e desenvolvimento. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.) **A soja no Brasil**. Campinas: IAC, 1981, p. 73-104.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. In: BONATO, E.R. (Ed) **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. cap. 1, p. 21-44.

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

OLIVEIRA, A.L.M; URQUIAGA, S; DÖBEREINER, J; BALDANI, J.I. Biological nitrogen fixation (BNF) in micropropagated sugarcane plants inoculated with different endophytic diazotrophic bacteria. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, v. 38, 425 p.

PANDEY, A.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; PALNI, L.M.S. Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian central Himalaya. **Current Microbiology**, New York, v. 56, p. 102-107, 2006.

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

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

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

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by triptophan and the stationary-phase sigma factor RpsS. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p.635-642, 2002a.

PEIXOTO NETO, P.A.S; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PELCZAR Jr, J.M., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. Objetivos da Microbiologia. In:_____. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996, cap. 2, p. 52-74. v.1, 2ª ed. 524p.

PEREIRA, J.O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guyanensis* e *Musa cavendish***. 1993. 105p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993a.

PEREIRA J.O; AZEVEDO, J.L, PETRINI, O. Endophytic fungi of stylosanthes. **Mycologia**, Lancaster, v. 85, p. 362-364, 1993b.

PEROVIC, O; KOORNHOF, H.J.; CREWE-BROWN, H.H.; DUSE, A.G.; van NIEROP, W.; GALPIN, J.S. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in an academic hospital in South Africa **South African Medical Journal**, Pretoria, v. 98, p. 626-632, 2008.

PROBANZA, A. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 182, p. 59-66, 1996.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; van DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P. Essay - the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

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

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

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

RICKLEFS, R.E. Estrutura da comunidade. In: _____. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, cap. 22, p. 333-348.

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

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

SANTOS, M.H.L.C.; MARIANO, R.L.R.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; WILLADINO, L.; LIMA, G.P.P. Bactérias promotoras de crescimento nodesenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, São Paulo, v. 32, p. 1-8, 2005.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1475- 1482, 2003.

SELVAKUMAR, G.; KUNDU, S.; GUPTA, A.D.; SHOUCHE, Y.S.; GUPTA, H.S. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of Kudzu (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. **Current Microbiology**, New York, v. 56, p. 134- 139, 2008.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASAMY, K. Annapurna role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 25-29, 2007.

SERGEEVA, E; HIRKALA, D.L.M.; NELSON, L.M. Production of indole-3-acetic-acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 297, p. 1-13, 2007.

SHULTZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S; AUSTIN, J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 1447-1450, 1993.

SOAVE, J.; MORAES, S.A. Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes. In: SOAVE, J., WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, p. 192-259.

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

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

STONE, P.W.; POGORZELSKA, M.; KUNCHES, L.; HIRSCHHORN, L.R. Hospital Staffing and Health Care–Associated Infections: A Systematic review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 47, p. 937–44, 2008.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, Rockville, v. 55, p. 415–424, 2008.

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F.; COSTA, F.E.C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 43-49, 2007.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.1016-1024, 1979.

TIMMS-WILSON, T.M., ELLIS R.J., RENWICK, A.; RHODES D.J.; MAVRODI, D;V.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S.; BAILEY, M.J. Chromosomal insertion of phenazine-1-carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, p. 1293-1300, 2000.

THOMAS, P.; SWARNA, G.K.; ROY, P.K.; PATIL, P. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 93, p. 55-63, 2008.

TOYAMA, H.; ANTHONY, C.; LIDSTROM, M.E. Construction of insertion and deletion mxa mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.166, p. 1-7, 1998.

TREVET, I.W.; HOLLIS, J.P. Bacteria in the storage organs of healthy plants. **Phytopathology**, Lancaster, v. 38, p. 960-967, 1948.

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

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

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

WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; GARDENER, B.B.; THOMASHOW, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.

WETZEL, M.M.V.S. Fungos do armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987, cap. 9, p. 260-275.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.52, p. 487-511, 2001.

WI, Y.M.; SOHN, K.; RHEE, J.; OH, W.S.; PECK, K. R.; LEE, N.Y; SONG, J. Spontaneous bacterial peritonitis due to *Ochrobactrum anthropi* : a case report. **Journal of Korean Medical Science**; Seoul, v. 22, p. 377-379, 2007.

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

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L., Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Stanford, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WOLFE, B.A.; BUSH, M.; MONFORT, S.L.; MUMFORD, S.L.; PESSIER, A.; MONTALI, R.J. Abdominal lipomatosis attributed to tall fescue toxicosis in deer. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 213, p.1783–1786, 1998.

ANEXOS

ANEXO A - Gêneros de bactérias endofíticas obtidos de sementes de soja. Identificação por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

(continua)

Isolado	Tratamento*	Identificação (gênero)	Similaridade (%)**
1D (1)	T	<i>Tsukamurella</i> sp.	97
11B (2)	T	<i>Brevibacterium</i> sp.	98
16A (3)	T	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
10A (4)	T	<i>Curtobacterium</i> sp.	97
31D (5)	C	<i>Microbacterium</i> sp.	98
3C (6)	T	<i>Microbacterium</i> sp.	99
4E (7)	T	<i>Microbacterium</i> sp.	100
33B (8)	C	<i>Pantoea</i> sp.	99
13C (9)	T	<i>Methylobacterium</i> sp.	97
14A (10)	T	<i>Methylobacterium</i> sp.	96
36B (11)	C	<i>Methylobacterium</i> sp.	99
38D (12)	C	<i>Methylobacterium</i> sp.	99
80A (13)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
98A (14)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
115B (15)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
85A (16)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	98
100A (17)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	98
101A (18)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
108E (19)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	98
97A (20)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
26C (21)	T	<i>Enterobacter</i> sp.	99
62A (22)	T	<i>Citrobacter</i> sp.	100
110A (23)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
43A (25)	T	<i>Bacillus</i> sp.	100
68G (26)	C	<i>Methylobacterium</i> sp.	99
68I (27)	C	<i>Methylobacterium</i> sp.	99
78A (28)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	97
91A (29)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
110B (30)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
131A (31)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
118B (32)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
59A (33)	T	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
42A (34)	C	<i>Bacillus</i> sp.	100

ANEXO A - Gêneros de bactérias endofíticas obtidos de sementes de soja. Identificação por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

(conclusão)

Isolado	Tratamento*	Identificação (gênero)	Similaridade (%)**
121B (35)	C	<i>Bacillus</i> sp.	100
6A (36)	T	<i>Bacillus</i> sp.	100
15C (37)	T	<i>Pseudomonas</i> sp.	100
24E (38)	T	<i>Ochrobactrum</i> sp.	100
47A (39)	T	<i>Bacillus</i> sp.	99
73B (40)	C	<i>Bacillus</i> sp.	99
107A (41)	C	<i>Bacillus</i> sp.	100
54D (42)	C	<i>Ochrobactrum</i> sp.	100
27E (43)	T	<i>Chryseobacterium</i> sp.	100
56B (44)	C	<i>Ochrobactrum</i> sp.	100
64E (45)	T	<i>Paenibacillus</i> sp.	100
129B (46)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
70A (47)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
69B (48)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
124D (49)	C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99
125E (50)	C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99
35A (51)	C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99
41B (52)	C	<i>Bacillus</i> sp.	99
106B (53)	C	<i>Bacillus</i> sp.	100
61A (54)	T	<i>Bacillus</i> sp.	99
71A (55)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
82A (56)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99
67A (57)	T	<i>Enterobacter</i> sp.	100
46A (58)	T	<i>Bacillus</i> sp.	100
53B (59)	C	<i>Ochrobactrum</i> sp.	99
129D (60)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	100
122D (61)	C	<i>Acinetobacter</i> sp.	97
19A (62)	T	<i>Streptomyces</i> sp.	99
22A (63)	T	<i>Micromonospora</i> sp.	97

*T = Semente geneticamente modificada (transgênica); C = Semente convencional

** http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)