



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA  
DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO  
(*Zea mays L.*)”**

DANILO DA SILVA LIMA

Anápolis-GO

2013

DANILO DA SILVA LIMA

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA  
DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO  
(*Zea mays L.*)”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora, do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, da Universidade Estadual de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet

Anápolis-GO

2013

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE  
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO (*Zea mays* L.)

DANILO DA SILVA LIMA

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



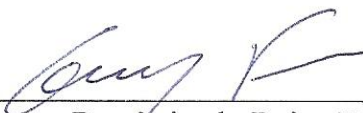
---

Profa. Dra. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet (UEG)



---

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)



---

Prof. Dr. Anderson Petrónio de Brito Ferreira (EMBRAPA)

ANÁPOLIS, GO – BRASIL  
OUTUBRO – 2013

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que Ele fez, tem feito e ainda fará. Sei que esse trabalho é fruto de sua misericórdia e bondade, e de suas promessas que são infalíveis. Obrigado Senhor, pela concretização de mais um sonho.

Aos meus pais pelas constantes orações e encorajamento prestados em todo o tempo. Muito obrigado por tudo! Amo vocês.

Ao meu grande amigo e irmão Maurício, pelo incentivo e atenção demonstrada nas horas mais difíceis que ocorreram ao longo dessa trajetória. À querida amiga Weslany pela amizade, apoio e momentos de alegria proporcionados por sua agradável companhia.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica de Microorganismos por toda atenção gentilmente prestada desde a fase de adaptação até as fases finais de execução desse trabalho, e pelas experiências científicas compartilhadas.

À FAPEG pelo apoio financeiro e incentivo ao desenvolvimento da pesquisa, bem como à Universidade Estadual de Goiás por fornecer essa valiosa oportunidade de aprimoramento científico e intelectual. Aos professores componentes da banca examinadora, por aceitarem participar da avaliação desse trabalho.

Em especial, agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet, por me proporcionar o privilégio de conhecer novos e fascinantes caminhos do universo intelectual, levando-me a ter experiências, que muito contribuíram para a ampliação da minha capacidade de investigação científica, e que certamente, ficarão eternizadas em minha memória. Obrigado por tudo!

“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.”

Romanos

11:36

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xix
<b>RESUMO</b> .....	xx
<b>ABSTRACT</b> .....	xxii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
1. A Cultura do Milho.....	4
2. Interação Planta-Bactéria .....	7
3. Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas .....	9
3.1. Bactérias Produtoras de Fitohormônios .....	10
3.2. Microrganismos Solubilizadores de Fosfato Inorgânico .....	12
3.3. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio .....	14
3.3.1. Rizóbios.....	17
4. A Importância das Técnicas Moleculares no Estudo de Diversidade.....	19
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
1. Material Biológico .....	24
2. Armazenamento e Manutenção de Bactérias .....	24
3. Caracterização Morfofisiológica.....	24
3.1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas.....	25
3.2. Teste de Crescimento em Fonte de Carbono .....	25
4. Caracterização Bioquímica.....	26
4.1. Coloração Gram.....	26
4.2. Teste de Solubilização de Fosfato .....	27
4.3. Teste de Citrato .....	27
4.4. Teste de Urease .....	28

4.5. Teste de Protease .....	29
4.6. Teste de Catalase .....	29
5. Caracterização Molecular .....	30
5.1. Extração do DNA .....	30
5.2. Análise do DNA Extraído e dos Fragmentos da PCR.....	31
5.3. Caracterização Genética por Análise da Região BOX-PCR .....	31
5.4. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região Intergênica 16S-23S rRNA .....	32
5.5. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região 16S rRNA .....	33
5.5.1. Amplificação do Gene 16S rRNA .....	33
5.5.2. Análise de Restrição dos Fragmentos da Região 16S rRNA Amplificados por PCR.....	34
5.5.3. Análise dos Dados .....	34
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas .....	36
2. Teste de Crescimento em Fonte de Carbono.....	41
3. Coloração Gram.....	43
4. Teste de Solubilização de Fosfato.....	44
5. Teste de Citrato.....	49
6. Teste de Urease.....	51
7. Teste de Protease.....	53
8. Teste de Catalase.....	56
9. Caracterização Genética por Análise da Região BOX-PCR.....	58
10. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região Intergênica 16S-23S rRNA.....	64
11. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região 16S rRNA.....	68
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	79
ANEXO I.....	97
ANEXO II.....	101
ANEXO III.....	103



## LISTA DE ABREVIACOES

AIA -  cido indol acético  
CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono  
DNA -  cido desoxirribonucleico  
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
EDTA - *ethylene diamine tetra aceticacid*  
FBN - fixa o biológica de nitrogênio  
g - gramas  
H<sup>+</sup> -  ion hidrogênio  
H<sub>2</sub>O -  gua  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
ha - *hectare*  
HCl -  cido clorídrico  
IE -  ndice Enzimático  
IS –  ndice de Solubiliza o  
kpb – kilo pares de bases  
kg – kilo gramas  
KCl - cloreto de potássio  
KNO<sub>3</sub> - nitrato de potássio  
L - litros  
M - mol  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio  
mL - mililitros  
mM - milimolar  
mm - milimetro  
mmol - milimolar  
N<sub>2</sub> - gás nitrogênio  
NaCl - cloreto de sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ng - nanogramas

NH<sub>3</sub> - amônia

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - íon amônio

*nir* - gene que codifica para a enzima redutase de nitrato

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - íon nitrito

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - íon nitrato

O<sub>2</sub> -oxigênio gasoso

P.A. - para análise

pb - pares de bases

PCR - *polymerase chain reaction*

pH - potencial hidrogeniônico

pmol - picomol

*rDNA* - DNA ribossomal

RPCP - Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas

RNAse - ribonuclease

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

*sp.*- várias espécies

*spp.*- espécie não determinada

TBE - tampão *tris/borate/EDTA*

ton/ha - toneladas por *hectare*

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

UV - ultravioleta

V - volts

µg - micrograma

µL - microlitro

µM - micromol

## YMA - *Yeast Mannitol Agar*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Dendrograma de similaridade utilizando os dados das caracterizações morfológicas de 20 bactérias isoladas de raízes de plantas de milho e 4 estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*). O agrupamento das bactérias foi realizado por meio do programa NTSYS utilizando o coeficiente de Jaccard.....40
- Figura 2:** Coloração de gram em objetiva de imersão (100x) de bactérias gram positivas e gram negativas de bactérias isoladas de raízes de plantas de milho. (1): MT13 bacilo gram-negativo; (2): MT8 bacilo gram-positivo. ....43
- Figura 3:** Formação de halo de degradação observado em meio sólido NBRIP (1, 2, 3 e 4) e Pikovskaya (5, 6, 7 e 8) para os isolados positivos. Bactérias: 1- Isolado MT13; 2- Isolado MT26; 3- Isolados MT42, MT43, MT45 e MT51; 4- Isolados MT74, MT75, Estirpes Referências SEMIA 5079, SEMIA 6161, SEMIA 4077 e SEMIA 3012; 5- Isolados MT74, MT75, Estirpes Referências SEMIA 5079, SEMIA 6161, SEMIA 4077 e SEMIA 3012; 6 - Isolados MT42, MT45, MT51 e MT70; 7- Isolado MT26; 8- Isolado MT13 ..... 45
- Figura 4:** Identificação da atividade de citrato liase das bactérias isoladas de milho em meio de cultura sólido Citrato de Simmons. (+) cor azul e (-) cor verde. Bactérias: 1- Isolado MT8; 2- Isolado MT10; 3- Isolado MT13; 4- Isolado MT14; 5- Isolado MT22; 6- Isolado MT23; 7- Isolado MT26; 8- Isolado MT29; 9- Isolado MT30; 10- Isolado MT31; 11- Isolado MT39; 12- Isolado MT40; 13- Isolado MT41; 14- Isolado MT42; 15- Isolado MT43; 16- Isolado MT45; 17- Isolado MT51; 18- Isolado MT70; 19- Isolado MT74; 20- Isolado MT75; 21- Estirpe SEMIA 5079; 22- Estirpe SEMIA 6161; 23- Estirpe SEMIA 4077; 24- Estirpe SEMIA 3012..... 50

**Figura 5:** Identificação da atividade de urease das bactérias isoladas de milho em meio de cultura sólido Uréia Base. (+) rosa e (-) amarelo. Bactérias: 1- Isolado MT8; 2- Isolado MT10; 3- Isolado MT13; 4- Isolado MT14; 5- Isolado MT22; 6- Isolado MT23; 7- Isolado MT26; 8- Isolado MT29; 9- Isolado MT30; 10- Isolado MT31; 11- Isolado MT39; 12- Isolado MT40; 13- Isolado MT41; 14- Isolado MT42; 15- Isolado MT43; 16- Isolado MT45; 17- Isolado MT51; 18- Isolado MT70; 19- Isolado MT74; 20- Isolado MT75; 21- Estirpe SEMIA 5079; 22- Estirpe SEMIA 6161; 23- Estirpe SEMIA 4077; 24- Estirpe SEMIA 3012..... 52

**Figura 6:** Formação de halo de degradação proteolítica observado em meio mínimo sólido acrescido de proteínas do leite 42% para os isolados positivos. Bactérias: 1- Isolado MT30; 2 - Isolado MT22; 3 - Isolado MT13; 4 - Isolado MT70; 5 - Isolado MT13; 6 - Estirpe SEMIA 3012; 7 - Isolado MT40.....54

**Figura 7:** Dendrograma das caracterizações bioquímicas de 20 bactérias isoladas de raízes de plantas de milho e 4 estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*). O agrupamento das bactérias foi realizado por meio do programa NTSYS utilizando o coeficiente de Jaccard e o agrupamento por UPGMA.....58

**Figura 8:** Perfil eletroforético dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região BOX (*primer* BOX A1R). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -1kb DNA Ladder..... 59

**Figura 9:** Perfil eletroforético de 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região BOX (*primer* BOX A1R). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Estirpe SEMIA 5079; Linha 25 - Estirpe SEMIA 6161; Linha 26 - Estirpe SEMIA 4077; Linha 27 - Estirpe SEMIA 3012; Linha 28 -1kb DNA Ladder ..... 60

**Figura 10:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por BOX PCR de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência : SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) ..... 61

**Figura 11:** Perfil eletroforético dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região intergênica 16S-23S rRNA (*primers* pHR e p23). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -1kb DNA Ladder ..... 65

**Figura 12:** Perfil eletroforético de 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região intergênica 16S-23S rRNA (*primers* pHR e p23) Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43;

Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Estirpe SEMIA 5079; Linha 25 - Estirpe SEMIA 6161; Linha 26 - Estirpe SEMIA 4077; Linha 27 - Estirpe SEMIA 3012; Linha 28 -1kb DNA Ladder65

**Figura 13:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região intergênica 16S-23S rRNA por PCR de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*)..... 67

**Figura 14:** Perfil eletroforético de 20 bactérias e 4 estirpes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA (*primers* Y1 e Y3). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -1kb DNA Ladder; Linha 15 - Isolado MT41; Linha 16 - Isolado MT42; Linha 17 - Isolado MT43; Linha 18 - Isolado MT45; Linha 19 - Isolado MT51; Linha 20 - Isolado MT70; Linha 21 - Isolado MT74; Linha 22 - Isolado MT75; Linha 23 - Estirpe SEMIA 5079; Linha 24 - Estirpe SEMIA 6161; Linha 25- Estirpe SEMIA 4077; Linha 26 - Estirpe SEMIA 3012; Linha 27 -1kb DNA Ladder69

**Figura 15:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *HaeIII*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13;

Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -100 pb DNA Ladder..... 70

**Figura 16:** Perfil eletroforético de ARDRA de 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *HaeIII*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Isolado SEMIA 5079; Linha 25 - Isolado SEMIA 6161; Linha 26 - Isolado SEMIA 4077; Linha 27 - Isolado SEMIA 3012; Linha 28 -100 pb DNA Ladder..... 71

**Figura 17:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AfaI*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -100 pb DNA Ladder..... 72

**Figura 18:** Perfil eletroforético de ARDRA de 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AfaI*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 -



Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Isolado SEMIA 5079; Linha 25 - Isolado SEMIA 6161; Linha 26 - Isolado SEMIA 4077; Linha 27 - Isolado SEMIA 3012; Linha 28 -100 pb DNA Ladder..... 72

**Figura 19:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AluI*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -100 pb DNA Ladder..... 73

**Figura 20:** Perfil eletroforético de ARDRA de 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AluI*. Gel de Agarose (0,8%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Isolado SEMIA 5079; Linha 25 - Isolado SEMIA 6161; Linha 26 - Isolado SEMIA 4077; Linha 27 - Isolado SEMIA 3012; Linha 28 -100 pb DNA Ladder..... 74

**Figura 21:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos obtidos do DNA de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium*

*freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*)) que foram amplificados da região 16S rRNA por PCR submetidos a digestão de 3 enzimas (*HaeIII*, *AfaI* e *AluI*) ..... 75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características morfológicas de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência, a partir da observação das colônias em meio sólido YAM .....	37
<b>Tabela 2:</b> Média e desvio padrão do Índice de Solubilização (IS) obtido pela razão diâmetro do halo de degradação/diâmetro da colônia observado nos isolados que cresceram nos meios NBRIP e Pikovskaya .....	47
<b>Tabela 3:</b> Média e desvio padrão do índice enzimático (IE) obtido pela razão halo de degradação/diâmetro da colônia observado nos isolados que cresceram no meio protease .....	55
<b>Tabela 4:</b> Crescimento bacteriano em 10 fontes de carbono.....	103

## RESUMO

Considerando as plantas cultivadas, o milho (*Zea mays L.*) é o grão mais importante do continente americano, tanto na alimentação quanto na economia. Muitas pesquisas têm mostrado que bactérias diazotróficas eficientes podem contribuir positivamente para o desenvolvimento da cultura do milho. A caracterização genética de microrganismos permite o aprofundamento dos estudos taxonômicos, fisiológicos, ecológicos e econômicos desses seres vivos. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica e genética de vinte bactérias isoladas de milho para posterior utilização como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (RPCP). Para o estudo foram observadas as características morfofisiológicas das colônias quanto à capacidade de utilização de 13 fontes de carbono e testes quanto à presença de enzimas (catalase, protease, citrato liase, e urease) e a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. Também foi realizado a análise genética por PCR dos genes 16S rRNA, da região intergênica 16S-23S rRNA e da região BOX das 20 bactérias e das estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*). Os resultados dos testes de 20 bactérias e das estirpes de referência foram analisados por similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Pelos dados morfológicos foram observados 6 grupos para as bactérias estudadas. Para os testes de utilização de fontes de carbono as bactérias foram positivas para todos os meios testado. Quanto à presença das enzimas, 50% foram catalases positivas, 95,8% citrato positivas, 20,8% urease positivas, 29,2% hidrolases de proteínas e 50% são solubilizadoras de fosfato inorgânico para os dois meios testados. Pela análise de agrupamento utilizando os dados bioquímicos foi possível caracterizar 7 grupos com similaridade em torno de 70%. Por estes resultados foi possível observar a grande diversidade metabólica das bactérias estudadas. Para a região BOX pode-

se caracterizar 9 grupos entre as bactérias com similaridade em torno 50%. A amplificação da região intergênica 16S-23S rRNA mostrou significativa variação no número e tamanho dos fragmentos. Através da aplicação do método de ARDRA para o gene 16S rRNA foram caracterizados 7 grupos que apresentaram um amplo perfil de polimorfismo. Estes resultados demonstram a variabilidade genética das bactérias associadas à planta de milho. As caracterizações morfológicas, bioquímicas e moleculares poderão auxiliar a seleção de bactérias candidatas a serem utilizadas para inoculação em ensaios *in vitro* e a campo para a cultura do milho no Cerrado goiano.

**Palavras-chave:** Milho, Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal, Caracterização de rizóbios em gramíneas.

## ABSTRACT

Whereas plants grown maize ( *Zea mays L.* ) is the most important grain of the American continent , both in food and in the economy. Many researchers have shown that efficient diazotrophs can contribute positively to the development of corn . Genetic characterization of microorganisms allows deepening the taxonomic , physiological , ecological and economic studies of these living beings . The aim of this work was the characterization and genetic Morphophysiological twenty bacteria isolated from corn for later use as promoting rhizobacteria to plant growth ( PGPR ) . To study the physical and physiological characteristics of the colonies as the capacity utilization of carbon sources 13 and testing for the presence of enzymes ( catalase , protease , citrate lyase and urease ) and the ability to solubilize inorganic phosphate was observed. Genetic analysis by PCR of 16S rRNA intergenic 16S - 23S rRNA region and the BOX of 20 bacteria and reference strains SEMIA 5079 ( *Bradyrhizobium japonicum* ) , SEMIA 6161 ( *Sinorhizobium freedii* ) , SEMIA 4077 ( *Rhizobium tropici* ) and SEMIA 3012 ( *Rhizobium leguminosarum* ) . The results of 20 tests and bacteria reference strains were analyzed for similarity using the Jaccard coefficient . By morphological data 6 groups were observed for the studied bacteria . For the tests using carbon sources bacteria were positive for all tested media . For the presence of enzymes, 50 % were positive catalase , citrate positive 95.8 % , 20.8 % positive urease , 29.2 % protein hydrolases and 50 % are solubilizing inorganic phosphate for both media tested . Using cluster analysis using biochemical data was possible to characterize 7 groups with similarity around 70 % . For these results we observed the great metabolic diversity of bacteria studied . For the region - BOX can 9 to characterize groups of bacteria with around 50% similarity. Amplification of 23S rRNA - intergênica16S region showed significant variation in the number and size of the fragments . By applying the method to ARDRA 16S rRNA gene

7 groups with a broad profile of polymorphism were characterized . These results demonstrate the genetic variability of bacteria associated with plant development . The morphological , biochemical and molecular characterizations may help to select candidates to be bacteria used for inoculation in vitro assays and field for maize in Goias Cerrado.

**Key words:** Corn, Plant Growth Promoting Bacteria, Characterization of rhizobia in grasses.

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) se apresenta como um dos cereais de maior relevância na alimentação e, considerando as plantas cultivadas, o milho é o grão mais importante do continente americano, tanto na alimentação quanto na economia (LOPES et al., 2008).

Nos últimos anos a produção nacional de milho vem apresentando destaque no cenário internacional, sendo o Brasil um dos grandes produtores mundiais juntamente com os Estados Unidos e a China. No entanto, a manutenção de lavoura com perspectivas de alta produtividade exige o uso de grande quantidade de fertilizantes nitrogenados para a adubação do milho (MACHADO et al., 1998).

Muitas pesquisas têm mostrado que bactérias diazotróficas eficientes podem contribuir positivamente para o desenvolvimento da cultura do milho (ZILLI et al., 2007; PERIN, 2007; ALVES, 2007).

Já foi observado que existem associados ao sistema radicular, bactérias fixadoras de nitrogênio (ROESCH, 2007). Estas bactérias realizam a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) convertendo o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ), com gasto de energia na forma de ATP (BHATTACHARJEE et al., 2008).

As plantas podem incorporar o nitrogênio por meio da FBN realizada pelas bactérias diazotróficas, o que influencia diretamente no seu crescimento por meio de uma série de mecanismos, tais como: a capacidade de produzir fitormônios, a indução da absorção de nutrientes e a resistência à doenças, atuando assim como um agente promotor de crescimento no vegetal (BASHAN et al., 2004).



A partir da rizosfera de milho, trigo e outras gramíneas, têm sido realizado o isolamento de bactérias diazotróficas, com o objetivo de avaliar a viabilidade agronômica da FBN proporcionada por esses microrganismos. Além de serem capazes de realizar a FBN, muitos estudos também reportam que há interferência dessas bactérias no crescimento das plantas e na morfologia das raízes através da biossíntese de hormônios vegetais (BASHAN E HOGUIN, 1997; ZAIED et al., 2003).

A aplicação dos métodos moleculares baseada nos estudos genéticos de bactérias representa uma fonte abundante de informações para bactérias do gênero *Rhizobium*. Devido aos métodos moleculares de análise filogenética, a taxonomia de bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas em diferentes ecossistemas, em geral tem sofrido uma revisão significativa (JUNIOR et al., 2009).

Há poucos estudos no Brasil, principalmente em Goiás, que enfatizem o isolamento e a caracterização de bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento associadas à raiz de plantas de milho para testes de campo ou “in vitro”, com a finalidade de seleção de genótipos de milho responsivos à inoculação. Neste sentido o isolamento e a caracterização genética de bactérias associadas ao milho é uma etapa fundamental (SOUZA et al., 2010).

## **OBJETIVOS**

### *1. Objetivo Geral*

Realizar a caracterização morfofisiológica e genética de vinte bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays L.*).

### *2. Objetivos específicos*

- Determinar as características morfológicas dos isolados.
- Caracterizar fisiologicamente os isolados por testes bioquímicos e enzimáticos para obtenção de sua diversidade metabólica.
- Caracterizar geneticamente os isolados de milho, usando os marcadores moleculares por PCR do gene 16S rRNA, da região intergênica entre 16S e 23S rRNA e região BOX.
- Determinar a diversidade genética dos isolados e agrupá-los por meio da análise de similaridade.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### *1. A Cultura do Milho.*

Estudos revelam que a cultura do milho data cerca de 6.000 anos de prática e com o passar do tempo, as descobertas relacionadas ao seu potencial nutricional levaram a expansão continental desse cereal (PEDRINHO, 2009).

Sabe-se que a planta de milho é encontrada nos mais diversos lugares, desde latitude 40° S até 58° N e altitudes que variam entre 3.000 m, nos Andes Peruanos, até abaixo do nível do mar, em regiões do mar Cáspio, o que a identifica como uma planta que apresenta excelentes capacidades adaptativas (CASTRO, 1999).

Entre os três principais grãos cultivados no mundo encontra-se o milho. Este cereal contribui, em muitos países da África, América Latina e parte da Ásia, com aproximadamente 20% de carboidratos e 15% de proteína para dieta da população. Em alguns casos, o grão de milho é utilizado na alimentação como única fonte diária de proteína (FRIEDMAN, 1996; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1988).

O grão seco de milho é constituído em média é de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo. A semente do milho é formada pelo endosperma, constituído principalmente do amido, pelo embrião, no qual se concentram quase as totalidades dos lipídios, além de quantidades importantes de proteínas e açúcares, e pelo pericarpo, composto principalmente de fibras, e pela ponta (PAES, 2008).

Devido sua importante composição nutricional, o milho obteve grande sucesso em sua utilização na alimentação de aves e suínos, devido ao seu alto

teor de amido e seu alto valor energético, fazendo parte da maior porção das rações fabricadas para este fim (PEIXOTO, 2002).

Em relação ao consumo humano, a forma de uso do milho pode ser industrial por moagem seca, gerando farinhas diversas como a do próprio milho, de fubá, quirera, óleo etc. ou úmida, gerando principalmente o amido, havendo ainda o consumo do grão leitoso (milho verde) (CRUZ, 2007).

Em processos industriais o milho pode ser transformado em vários subprodutos, como amido, óleo, proteína, adoçantes, margarinas, maionese, balas, xaropes, bebidas, biscoitos, cosméticos, salgadinhos entre outros (PEIXOTO, 2002; FAO, 1993).

Os resíduos de proteínas obtidos do endosperma no processo de produção do amido de milho são considerados de grande importância industrial em países desenvolvidos, sendo aproveitados como matéria-prima para a fabricação de filmes comestíveis destinados ao revestimento de frutas, verduras e grãos, com a finalidade de ampliar a vida de prateleira desses produtos (PAES, 2006).

Esse grão ainda é aplicado em outros campos. Sua utilização tem aumentado e deverá crescer ainda mais no setor da produção de plásticos biodegradáveis a partir de amido de milho e na produção de etanol (DA RÓZ, 2003).

O Brasil e os Estados Unidos da América são os dois principais produtores de álcool de origem agrícola, sendo esta produção destinada ao ramo de transportes. Nos Estados Unidos, a fabricação do álcool, que tem como principal matéria prima o milho, é considerada uma das principais ferramentas para reduzir a dependência energética do país e está crescendo mais de 20% ao ano, desde 2001. A indústria de álcool recebe subsídios em nível federal e

estadual, cujo total estimou-se entre cinco e sete bilhões de dólares para o ano de 2006 (CHAVANNE, 2008).

Na agricultura, a planta de milho, assim como qualquer outra planta apresenta necessidades nutricionais que são determinadas pela quantidade de nutrientes que esta extrai durante o seu ciclo de vida. Esta extração total dependerá, portanto, do rendimento obtido e da concentração de nutrientes nos grãos e na palhada. Dessa forma, tanto na produção de grãos como na de silagem deve-se disponibilizar a planta a quantidade total de nutrientes que esta extrai e que devem ser fornecidos pelo solo e através de adubações (COELHO; DE FRANÇA, 2010).

O uso de fertilizantes nitrogenados na cultura de milho provoca um alto custo de produção para o agricultor, os quais são repassados ao consumidor. Sendo assim, existe a necessidade de avanços nas pesquisas sobre microrganismos que se encontram na rizosfera de diversos vegetais e que auxiliam os mesmos na obtenção de nutrientes, diminuindo o custo e aumentando a produção (PEDRINHO, 2009).

O crescente interesse pelo estudo da fixação biológica na agricultura visa minimizar o uso de fertilizantes minerais nitrogenados na produção dos cultivares. A utilização destes fertilizantes minerais está ligada a grandes desvantagens, sendo as principais delas o alto custo dos adubos e problemas ambientais, como a contaminação do lençol freático por excesso na aplicação de N, que é convertido na forma de nitrato (FERREIRA, 2008).

A interação entre fatores ambientais e o genótipo da planta do milho, influencia diretamente na sua produtividade, bem como a disponibilidade de nitrogênio no meio (IKEDA, 2010).

Uma variedade de bactérias diazotróficas pode colonizar a planta do milho, mas no que se refere à diversidade de espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio que apresentem relações simbióticas com essa planta, ainda não há conhecimentos bem definidos (ROESCH, 2007).

Considerando a necessidade de novas tecnológicas para os processos de produção do milho de forma mais adequada e eficiente, bem como a necessidade de diminuir o uso de fertilizantes derivados de fontes não renováveis na agricultura, estudos voltados para a utilização de bactérias diazotróficas podem ser uma alternativa. Ainda a caracterização destes microorganismos associados ao milho permite explorar melhor seus potenciais biotecnológicos, tornando-os focos de grande interesse (ROESCH, 2007).

## *2. Interação Planta-Bactéria.*

Estudos relatam três tipos de interações que podem ocorrer entre plantas e bactérias, sendo essas interações conhecidas como simbióticas, patogênicas e associativas (ROMEIRO, 2012). A eficácia dessas relações depende da adaptação dos microrganismos, que podem colonizar a superfície das plantas, caracterizada como colonização epifítica ou ocupar espaços dentro dos tecidos vegetais, relação conhecida como colonização endofítica (BRENCIC & WINANS, 2005).

Microrganismos endófitos são aqueles que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como as folhas, ramos e raízes (NETO et al., 2002).

Esse conjunto de microrganismos inclui principalmente fungos e bactérias, e ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causam prejuízos aos seus hospedeiros. Muito pelo contrário, os endófitos podem desempenhar

importantes funções para a sanidade vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, além de poder atuar no controle de insetos e até proteger a planta contra herbívoros (NETO et al., 2002).

Quando as plantas conseguem se estabelecer nos seus respectivos habitats, observa-se o desenvolvimento de mecanismos adaptativos interativos como as relações mutualísticas com microrganismos, como no caso dos fungos micorrízicos e das bactérias fixadoras de nitrogênio, que são endofíticos (NETO et al., 2002).

Da interação simbiótica entre plantas e bactérias diazotróficas resulta a ocorrência de diversos mecanismos, tais como, indução da expressão de genes responsáveis pelo crescimento dos pelos radiculares, mudanças nos níveis de fitormônios, mudanças na absorção de nutrientes, indução da extrusão de prótons auxiliando a fotossíntese ou através da excreção de substâncias pelas bactérias dentre elas as auxinas, as citocininas e as giberelinas que podem atuar no desenvolvimento da cultura, o que caracteriza essas bactérias como promotoras de crescimento vegetal (VERMA et al., 2001; SABINO, 2003; PEDRINHO, 2009).

A interação entre rizóbios e leguminosas pode ser citada como um exemplo bem conhecido de relação simbiótica que promove crescimento vegetal. Na simbiose endofítica, ocorre inicialmente o reconhecimento específico de sinais moleculares produzidos pela planta e pela bactéria, gerando o desenvolvimento de nódulos nas raízes (SPAINK, 2000) onde o endossimbionte atua como fixador de nitrogênio (FREITAS et al., 2007).

Apesar de as gramíneas não apresentarem formação de nódulos (PACHECO, 2008), vários grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio presentes no solo estão envolvidos em associações mutualísticas vantajosas que ocorrem

nas raízes de gramíneas, como a do milho (*Zea mays L.*). A bactéria contribui diretamente com o nitrogênio fixado para seu hospedeiro, e a planta fornece carboidratos aos microrganismos servindo como fonte de energia (RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004). Isso indica uma fonte de grande interesse para estudos desse tipo de associação, que pode trazer como benefício o aumento da produtividade (BOBATO, 2006).

### *3. Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas.*

Os microrganismos conhecidos como Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs) constituem um diversificado e numeroso grupo de bactérias encontrado no solo e quando em contato com plantas, promove um aumento da região radicular (PEDRINHO, 2009). Com o aumento da superfície da raiz, há uma maior eficiência na retirada de água, macro e micro nutrientes pelas plantas. Outro ponto relevante dessa interação é que as RPCPs desempenham um relativo efeito contrário sobre muitos microrganismos patogênicos, que leva a um eficiente controle biológico na natureza (PEDRINHO, 2009).

No interior da rizosfera das plantas, podem ser encontradas as rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs). Estas bactérias interagem com a rizosfera de forma que podem promover uma influência significativa sobre o crescimento das plantas (FIGUEIREDO et al., 2012). Como resultados desse tipo de interação podem ser formados plantas maiores, mais vigorosas, com maior produtividade e mais saudáveis por meio da atuação microbiológica (RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004).

As RPCPs podem atuar, indiretamente, pela supressão de doenças e, diretamente, pela produção ou alteração da concentração de fitormônios, fixação



de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, realizar a oxidação do enxofre, e promover o aumento da permeabilidade das raízes e a produção de sideróforos (MARIANO & KLOEPPER, 2000).

Estudos mostram que muitos grupos de bactérias podem se associar a plantas e promover crescimento vegetal como os gêneros *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Klebsiella sp.*, (IKEDA, 2010), *Azospirillum spp.*, (SILVA, 2010), *Sphingomonas spp.*, (VIDEIRA, 2008), *Rhizobium leguminosarum* (SILVEIRA, 2008) e *Pseudomonas sp.* (MARQUES et al., 2008).

O mecanismo de formação dos nódulos radiculares pelas bactérias é bastante complexo e ocorre em uma seqüência de eventos biológicos, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira, como na bactéria (HUNGRIA et al., 1994). As transformações bacterianas estão relacionadas principalmente ao recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e a capacidade redutora necessária para o processo de fixação biológica de nitrogênio, enquanto que as adaptações ocorridas na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (HUNGRIA et al., 1994).

As bactérias que apresentam uma variedade de características para a promoção de crescimento vegetal, como por exemplo, a capacidade de mineralização de nutrientes e produção de sideróforos ou solubilização de fósforo e produção de auxinas, são desejáveis para uma possível aplicação no campo, proporcionando o aumento da produção agrícola (VERMA et al., 2001).

### 3.1. Bactérias Produtoras de Fitormônios.

A produção de fitormônios como auxinas, citocinas e giberelinas por bactérias é de grande interesse para estudos de crescimento vegetal (GRAY &

SIMITH, 2005). Estas substâncias são reguladoras naturais de crescimento das plantas e também são capazes de interferir diretamente nos processos fisiológicos relacionados com o desenvolvimento vegetal (PEDRINHO, 2009).

As auxinas são hormônios vegetais requeridos em baixas concentrações e sua atuação se relaciona com o desenvolvimento da raiz e a divisão celular. No entanto concentrações muito altas as auxinas causam efeito antagônico inibindo o alongamento celular e, portanto, o crescimento de todo o vegetal (RAVEN, 1992).

É bastante comum a produção desses fitormônios por bactérias promotoras de crescimento como: *Aeromonas veronas*, *Agrobacterium* sp, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp, *Rhizobium* sp e *Enterobacter* sp, entre outras (VESSEY, 2003). Ainda na família *Rhizobiaceae* encontram-se gêneros de bactérias que podem colaborar no desenvolvimento de raízes por meio da produção do ácido indol acético (AIA) e formação de nódulos em leguminosas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

O hormônio vegetal auxina induz o alongamento das células vegetais promovendo crescimento e é sintetizado principalmente no meristema apical (gema) do caule, e transportado através das células do parênquima até as raízes através de transporte unidirecional seguindo sempre em direção à extremidade das raízes (RAVEN, 1992).

É conhecido que cerca de 80% das bactérias isoladas de rizosfera são capazes de produzir auxina (ZAHAROVA et al., 1999). Para a produção desse hormônio diversas plantas e microorganismos utilizam como precursor o aminoácido L-triptofano (L-Trp) e a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase-EC 4.1.1.74) é a enzima-chave para a biossíntese deste fitormônio (LEBUHN & HARTMANN, 1993).

Certas bactérias também podem produzir citocininas, substâncias conhecidas por induzirem processos mitóticos nas células vegetais e promovem o retardo do envelhecimento das plantas. Sintetizadas nas raízes, essas moléculas são transportadas para todas as partes da planta através do xilema (RAVEN, 1992). As citocininas podem ainda interagir com as auxinas e desta forma atuam sobre a formação de células precursoras do sistema vascular e aumentam a sensibilidade dessas células à auxina, induzindo de forma indiretamente o processo de diferenciação dos vasos e o desenvolvimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2008). Entre as bactérias capazes de produzir citocininas pode ser mencionada a espécie *Pseudomonas fluorescens* que produz elevadas concentrações deste fitormônio (GRAY & SMITH, 2005).

Já as giberelinas são hormônios sintetizados essencialmente nas raízes e nos brotos foliares, onde estimulam o crescimento de caules e folhas, mas, no entanto apresentam baixo efeito sobre o crescimento das raízes. Quando em associação com as auxinas, as giberelinas auxiliam no desenvolvimento dos frutos e junto à citocininas, executam um importante papel nos mecanismos voltados a germinação das sementes (ROSS et al., 2000). Bactérias como o *Bacillus* sp. produzem altos níveis de giberelinas que apresentam ação positiva no crescimento de caules e galhos de diversas plantas (GRAY & SMITH, 2005).

### 3.2. *Microrganismos Solubilizadores de Fósforo Inorgânico.*

Depois do nitrogênio, o fósforo (P) é considerado o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal sendo o principal componente de moléculas vitais como a lecitina, nucleotídeos, entre outras, e está relacionado com fenômenos de armazenamento e transferência de energia na planta, sob a forma de ATP (FORNASIERI, 1992).

Rochas, apatitas e outros minerais primários formados em tempos remotos, comportam a maior reserva de fósforo conhecida. Sua distribuição é bastante elevada nos solos tanto na forma orgânica quanto na forma inorgânica. Quando na forma orgânica, compõe proteínas, aminoácidos e ácidos graxos e para ser absorvido pelas plantas, necessita ser mineralizado (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

Entende-se por mineralização o processo de solubilização de fosfatos orgânicos que ocorre a partir da utilização de restos vegetais e animais que apresentam elevados teores de compostos fosfatados. Esta mineralização é catalisada pela ação de enzimas denominadas de fosfatases ou fosfohidrolases, que podem ser classificadas como ácidas ou alcalinas de acordo com o pH ótimo de atividade. Estas enzimas podem ser secretadas fora da membrana plasmática, ou permanecerem retidas na membrana como proteínas solúveis (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

O processo de solubilização de fosfato depende de fatores ambientais como a disponibilidade adequada de nutrientes e a interação da planta com outros organismos no ambiente, além de outros mecanismos relacionados a promoção do crescimento vegetal. Embora os níveis de fósforo no solo sejam bastante elevados (400 a 1200 mg/kg de solo), a concentração de fósforo solúvel, disponível para assimilação pelas raízes das plantas é muito baixa, normalmente 1 mg/kg de solo ou menos (PRINSEN, 1999)

Para que ocorra um bom aproveitamento do fosfato presente no solo tem-se pesquisado processos microbiológicos para esse fim (ZAPATA & AMANN, 1995). Existem muitos estudos cuja finalidade é de verificar a capacidade de diferentes espécies de bactérias em realizar os mecanismos de solubilização de compostos de fosfato inorgânico. Dentre os grupos de bactérias que apresentam essa habilidade estão os pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*,

*Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

Na família *Rhizobiaceae* há gêneros bacterianos capazes de realizar a fixação de N<sub>2</sub> e a solubilização de compostos de fosfato inorgânico, processos importantes que influenciam diretamente e positivamente a fisiologia do vegetal (GYANESHWAR, et al., 2002).

A disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos para as plantas ocorre pela atuação de microrganismos solubilizadores de fosfatos por meio do processo de mineralização do fosfato pela acidificação biológica que desempenha um papel importante no aumento do teor de fósforo na solução do solo, aumentando a absorção deste nutriente pelas plantas, resultando em bom crescimento vegetal e maior rendimento das culturas (SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato em inoculantes ou o manejo de suas populações no solo constituem alternativas para a melhoria do suprimento de fósforo para as plantas (KERBAUY, 2004). Para a promoção de uma nutrição vegetal mais equilibrada, a co-inoculação de espécies solubilizadoras de fosfato com espécies diazotróficas, bem como o uso conjunto de fungos micorrízicos arbusculares pode atuar como um método eficiente para esta finalidade, e isso pode gerar efeitos sinérgicos na promoção do crescimento vegetal (BELIMOV et al., 1995).

### 3.3. *Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.*

Um dos elementos mais importantes para a produtividade de diversas culturas é o nitrogênio (N<sub>2</sub>), pois faz parte de importantes biomoléculas como os

ácidos nucleicos, aminoácidos, bases nitrogenadas, clorofila, dentre outras (FERREIRA, 2008).

Cerca de 94% do nitrogênio encontra-se na crosta terrestre e o restante na atmosfera na forma de  $N_2$ , e sua assimilação sob essa forma química não é acessível para a maioria dos seres vivos. Sua disponibilidade depende de cerca de 90% da atuação de microrganismos diazotróficos, ou seja, que possuam a enzima nitrogenase cujo papel está em reduzir o  $N_2$  atmosférico a substâncias que podem ser assimiladas pelos vegetais e outros seres vivos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

O processo de absorção de nitrogênio torna-se possível quando as moléculas se apresentam na forma de íon nitrato ( $NO_3^-$ ) ou íon amônio ( $NH_4^+$ ), contudo os organismos eucariontes são incapazes de absorver o  $N_2$  e convertê-lo a uma forma assimilável (HUNGRIA, 2000). O nitrato constitui a forma mais utilizada, já que o nitrogênio amoniacal liberado pela decomposição da matéria orgânica do solo é rapidamente convertido a nitrato, e como amônio pode ser absorvido quando há condições de pH muito ácido, altas concentrações de fenóis ou anóxia (MADIGAN et al., 2010).

As bactérias diazotróficas realizam a fixação biológica utilizando seu complexo enzimático denominado de nitrogenase que apresentam a capacidade de converter  $N_2$  em amônia, tornando-o disponível para a planta (STROSCHEIN, 2007), executando um papel significativo na agricultura. (GUIMARÃES, 2003). Na cultura de milho, por exemplo, processos bioquímicos fundamentais a sobrevivência dessa planta são mediados pela utilização do nitrogênio, o que torna esse elemento um fator limitante na produção e no rendimento desse grão (MACHADO, 1997).

O emprego de bactérias fixadoras de nitrogênio tem causado grande impacto econômico na agricultura. Elas possuem a habilidade de utilizar nitrogênio atmosférico como fonte para crescimento e biossíntese, e contribuem para o fornecimento de nitrogênio a várias espécies de vegetais de importância agrônômica, como as leguminosas soja e feijão, além de espécies forrageiras (DOBEREINER et al, 1970; DOBEREINER & PEDROSA, 1987).

Através da utilização de microrganismos diazotróficos, o crescimento e o desenvolvimento do vegetal podem ser melhorados. A interação planta-bactéria caracteriza-se pela colonização de diferentes tecidos das plantas realizada pelos microrganismos, como raízes e folhas. Além disso, esses microrganismos podem auxiliar no desenvolvimento vegetal habitando a rizosfera da planta (BARRAQUIO, 1997; CHOUDHURY & KENNEDY, 2004).

A associação simbiótica entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de plantas de leguminosas, por exemplo, representa uma importante alternativa e com alta aceitabilidade para substituir, total ou parcialmente, a fertilização química (LIU et al., 2005).

As bactérias da família *Rhizobiaceae*, para plantas leguminosas, e outras do gênero *Azotobacter*, para gramíneas, constituem os grupos simbiontes mais importantes. Cerca de 85% da fixação de nitrogênio é feita biologicamente por esses microrganismos (DOBEREINER & PEDROSA, 1987).

Assim, essas bactérias que realizam Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) podem ser utilizadas para formulação de bioinoculantes que sejam capazes de substituir os adubos nitrogenados, uma vez que estes são responsáveis por gerar impactos ambientais e gastos econômicos no processo de cultivo de determinadas culturas (BARRAQUIO, 1997; CHOUDHURY & KENNEDY, 2004).

### 3.3.1. Rizóbios.

O estudo científico da diversidade e das relações interespecíficas cuja finalidade é caracterizar e agrupar de maneira ordenada as bactérias permite a determinação da sistemática bacteriana (TRUPER, SCHLEIFER, 1991).

O método de classificação de bactérias baseia-se na organização dos indivíduos em grupos (táxons) com base nas semelhanças e o processo de nomenclatura dos grupos é a definição dos nomes para os grupos taxonômicos conforme regras estabelecidas pelo “*International Code of Nomenclature of Bacteria*” (SNEATH, 1992).

Há diversos níveis de classificação para bactérias sendo o maior, chamado de Domínio. De uma forma geral, os procariotos são encontrados em dois Domínios, *Archaea* e *Bacteria*. Para cada Domínio são descritos as categorias taxonômicas convencionais tais como os Filos, Classes, Ordens, Famílias, Gêneros, Espécies e Subespécies (GARRITY; HOLT, 2001).

As bactérias capazes de formar nódulos e fixar o nitrogênio em relações simbióticas com plantas da família *Leguminosae* eram inicialmente indicadas pelo gênero *Rhizobium*. A partir do estudo de grupos com inoculação cruzada na interação bactéria e planta hospedeira, foram estabelecidos critérios que possibilitaram a descrição de seis espécies: *Rhizobium leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. lupini*, *R. melioli*, *R. phaseoli* e *R. trifoli* (FRED et al., 1932).

Nas pesquisas bacterianas, outros aspectos foram incorporados ao processo de análises para classificação de rizóbios tais como características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além da inoculação cruzada e do crescimento lento com reação alcalina em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono. Isso favoreceu a separação das bactérias simbióticas em dois grupos, de crescimento rápido e de crescimento lento, mas ainda assim



eram identificadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium* (BUCHANAN, 1980).

Estudos posteriores permitiram a reclassificação das bactérias pertencentes à espécie *Rhizobium japonicum*, em um novo gênero, *Bradyrhizobium*, sendo também definida uma espécie denominada de *Bradyrhizobium japonicum*. Esse novo gênero *Bradyrhizobium* foi definido pela observação de baixas taxas de crescimento apresentada pelas bactérias em estudo. Em sua primeira edição, o autor do Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática, prosseguiu em classificar as demais estirpes de crescimento rápido em cinco espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* (JORDAN, 1984).

Muitas mudanças ocorreram no processo de classificação dos rizóbios, sendo que atualmente são classificados da seguinte forma: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alfaproteobactéria*; Ordem: *Rhizobiales*; e distribuídos nas Famílias *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Methylobacteriaceae* (GARRITY; HOLT, 2001).

Os rizóbios são identificados ainda como um grupo de bactérias Gram-negativas que incluem entre outros, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, e *Mesorhizobium* que comportam numerosas espécies (GARRITY; HOLT, 2001). Além disso, existem outras bactérias recentemente descritas e também denominadas de rizóbios, por serem microssimbiontes de leguminosas, e que pertencem a gêneros bastante distintos, tanto na subclasse alfa, tais como *Devosia* (RIVAS et al., 2003) e *Methylobacterium* (JOURAND et al., 2004) como na subclasse beta, tais como *Ralstonia* (CHEN et al., 2001) e *Burkholderia* (CHEN et al., 2006).

A identificação de um numeroso grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio em estudos atuais tem gerado discussão sobre a taxonomia atual

desse grupo de bactérias, bem como a descrição de novas espécies de rizóbios (ZAKHIA; de LAJUDIE, 2001; VINUESA et al., 2005, MARTENS et al., 2007).

#### *4. A importância de Técnicas Moleculares no Estudo de Diversidade.*

A caracterização genética de microrganismos permite o aprofundamento dos estudos taxonômicos, fisiológicos, ecológicos e econômicos desses seres vivos, proporcionando a compreensão de sua diversidade e interação com o solo, elucidando aspectos práticos relacionados ao manejo do solo (FERREIRA et al., 2000).

A utilização de técnicas moleculares tem provocado o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a caracterização de populações microbianas, inclusive para estudos em nível de gênero, espécie e até mesmo estirpe (SCHNEIDER & DE BRUIJN, 1996).

A partir do progresso transformador da aplicação das técnicas moleculares para o estudo de microrganismos presentes solo, foram aprimorados inúmeros métodos de extração de DNA. Esses métodos envolvem procedimentos relacionados a quebra ou digestão de paredes e membranas celulares viabilizando a liberação do conteúdo genético celular e do material genético o que tem permitido o estudo e caracterização genética destes microrganismos (PEDRINHO, 2009).

A comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial a região que codifica a menor subunidade do ribossomo, 16S rRNA, representa um dos maiores progressos no uso de técnicas de biologia molecular, pois essa região é considerada conservada entre as bactérias, ao passo que releva as relações filogenéticas entre as espécies por ser suficientemente variável e conter

uma gama de informações pertinentes (WEISBURG et al.,1991; CHUEIRE et al., 2000). Por estas características o gene 16S rRNA se enquadra em conceitos que definem um marcador filogenético específico (PIAZA et al., 2006).

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é conhecida por auxiliar nos estudos de filogenia, e que permite a amplificação de seqüências definidas do DNA e as análises do gene 16S rRNA de bactérias fixadoras de nitrogênio (CHUEIRE, et al., 2000).

O 16S rRNA (ácido ribonucléico ribossômico) está presente na menor subunidade do ribossomo dos procariotos. Este gene apresenta tamanho suficiente para detecção de regiões divergentes, ausência de transferência lateral, e está disponível em grandes quantidades em bancos de dados e por isso é utilizado como marcador molecular para caracterizações genéticas (MALUCHE-BARETTA, 2007).

Vários trabalhos relataram que a utilização de genes ribossomais como o 16S rRNA é confiável para caracterizações genéticas de isolados pois estes apresentam um conjunto de características que podem ser aplicadas aos estudos filogenéticos. São encontrados em todos os seres vivos, isso porque a síntese de proteínas ribossomais é obrigatória. Estes genes formam ainda as principais estruturas dos ribossomos, estruturas presentes em grande quantidade nas células, o que facilita sua identificação e possuem regiões que mudam em taxas diferentes o que favorece as análises filogenéticas que podem ser executadas em vários níveis de resolução taxonômica. (WOESE, 1987; WOESE et al., 1990; WEISBURG et al., 1991; VANDAMME et al., 1996; GARRITY; HOLT, 2001).

O gene 16S rRNA contém informações referentes as características conservadas ao longo da evolução e pode indicar como os microrganismos estão relacionados durante o transformações sofridas há milhares de anos (WOESE,

1987). Variações e combinações de métodos estão sendo utilizadas para verificar a posição taxonômica das bactérias e, alguns, mostram boa correlação com o sequenciamento do gene 16S rRNA (JUNIOR et al., 2009).

Esse método pode ser executado utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores arbitrários ou complementares a determinada seqüência do genoma bacteriano e tem sido utilizado, por exemplo, para detecção, identificação e caracterização de estirpes de rizóbio (HARRISON et al., 1992; LAGUERRE et al., 1994).

O uso da técnica de amplificação da região 16S rRNA tem se mostrado eficiente para a identificação da diversidade bacteriana. Por meio dela é possível definir a posição dos procariotos em nível de gênero e fornece uma considerável base de dados para comparação de seqüências do rRNA no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (VIDEIRA, 2008).

Uma diversidade de espécies tem suas seqüências completas conhecidas e registradas em bancos genéticos, como o NCBI. A amplificação de regiões específicas do genoma e posterior sequenciamento de bases possibilita realizar a identificação pela comparação das seqüências obtidas com a de outros organismos disponíveis no banco de dados do NCBI (MARTINEZ-ROMERO, 1994).

Em relação a região intergênica 16S-23S rRNA, informações sobre suas seqüências vem sendo agregadas nos últimos anos, e o alinhamento de seqüências disponíveis em bancos de dados mostra que pode ocorrer variação considerável intra e inter-específica, tanto no tamanho como na seqüência de bases (LAGUERRE, et al., 1996)

A utilização de oligonucleotídeos iniciadores que correspondem a seqüências repetitivas de consenso no DNA do microrganismo representa uma

variação da técnica de PCR (DE BRUIJN, 1992). As seqüências repetitivas conhecidas como elementos BOX (seqüências repetitivas espalhadas no genoma), possuem uma sequencia específica que uma vez amplificadas, permitem a observação de padrões altamente característicos, quando as amostras são submetidas a separação em gel de agarose (SELENSKA-POBELL,1995).

O emprego da técnica BOX-PCR mostra vários benefícios já que é uma técnica rápida, de execução fácil e altamente discriminatória para espécies, produzindo resultados que representam bem as análises baseadas na homologia DNA-DNA. Esta técnica vem sendo muito utilizada para avaliar diversidade genética de populações microbianas (GRANGE & HUNGRIA, 2004; KASCHUK et al., 2006).

Os oligonucleotídeos iniciadores não são específicos para gênero, espécie ou estirpe, porém a técnica permite que os oligonucleotídeos iniciadores generalizados sejam utilizados para comparar diferentes bactérias dentro de uma mesma população. Considerada uma ferramenta universal, a técnica de BOX-PCR é utilizada em estudos de variações genômicas em organismos procariontes e reflete a variabilidade do genoma por inteiro (IGUAL et al., 2001).

Outra técnica utilizada em estudos de diversidade é a ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado), metodologia que consiste em análises combinadas de seqüências de DNA ribossomal amplificadas por PCR a partir da utilização de enzimas de restrição que gera como produto padrões de polimorfismo, sendo uma técnica bastante utilizada nos estudos de diversidade de rizóbio (LAGUERRE et al., 1994).

Não existem muitos estudos que enfatizem o isolamento e a caracterização de bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento associadas à raiz de plantas de milho, o que mostra a viabilidade desse estudo.

Este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização morfofisiológica e genética de vinte bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays L.*) cultivadas no Cerrado Goiano.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *1. Material Biológico.*

Foram utilizadas vinte bactérias da coleção de bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays L.*) do Laboratório de Bioquímica de microrganismos da UEG (Universidade Estadual de Goiás), UnuCET, Anápolis, GO.

Para fins de controle e comparação, também foram utilizadas as estirpes de rizóbio SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) obtidas da coleção de bactérias da Embrapa Soja de Londrina –PR, e da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

### *2. Armazenamento e Manutenção das Bactérias.*

Nesse estudo foram utilizadas vinte bactérias que foram submetidas ao cultivo em meio sólido YMA (VINCENT, 1970) e mantidas á temperatura de 30 °C para crescimento e análise de pureza. Posteriormente, as bactérias foram inoculadas em meio YMA líquido, sendo em seguida transferidas para microtubos e armazenadas à temperatura de 4 °C em solução de glicerol 40%. Depois foi produzido o estoque do material biológico em duplicata para realização dos testes de caracterização morfofisiológica e molecular.

### *3. Caracterização Morfofisiológica.*

Para a execução e avaliação dos testes de caracterização morfofisiológica foram consideradas as expressões das características relacionadas à morfologia das colônias e a capacidade de utilização de fontes de carbono pelas bactérias.

### *3.1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas.*

A caracterização morfológica foi baseada na observação e análise das características das colônias formadas pelas bactérias isoladas submetidas ao meio sólido YMA e crescidas por 48 horas. Os critérios adotados para essa análise foram: tamanho (grande ou puntiforme); forma (circular, irregular ou rizóide); borda (lisa, lobada, denteada ou ondulada); superfície (lisa, rugosa, pregueada ou raiada); consistência (cremosa, viscosa, granulosa ou seca); transparência (opaca, translúcida, transparente ou leitosa); coloração (amarelo ouro, amarelo claro, vermelha, rosada, branca, castanha, alaranjada ou creme); brilho (fosco ou brilhante); elevação (baixa, média ou alta) (UFBA, 2013).

### *3.2. Teste de Crescimento em Fonte de Carbono.*

Para o estudo de avaliação e identificação da capacidade metabólica dos isolados bacterianos em utilizar o carbono, foram testadas um total de 10 diferentes fontes de carbono. Foi analisada a capacidade de crescimento bacteriano segundo Hungria e colaboradores (1994), utilizando as seguintes fontes de carbono: ácido maleico, ácido málico, ácido nicotínico, arabinose, frutose, glicose, manitol, mio-inositol, sacarose e sorbitol. As placas foram confeccionadas em triplicata para cada fonte de carbono. As bactérias foram crescidas em meio de cultura YMA líquido por 24 horas. O meio de cultura sólido base utilizado foi o meio mínimo (HUNGRIA et al., 1994) sendo acrescido de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cada fonte de carbono. Fontes de amido e carboxi-



metil-celulose foram adicionadas na concentração de 4%. As bactérias cultivadas previamente no meio de cultura YMA foram transferidas para as placas de petri com as fontes de carbono através de um replicador (96 pinos) de colônias, que adicionou aproximadamente 3 µL das culturas bacterianas em cada quadrante. Foi avaliado o crescimento das colônias pelo período de 96 horas.

#### *4. Caracterização Bioquímica.*

Para a caracterização bioquímica foi considerado o teste de coloração gram e a observação da presença de sistema enzimático evidenciado em testes específicos para este fim.

##### *4.1. Coloração de Gram.*

O método de coloração consiste na separação de isolados bacterianos em gram-positivos e gram-negativos e permite a determinação da morfologia e do tamanho das bactérias analisadas. A eficácia do método esta relacionada à capacidade das paredes celulares das bactérias gram-positivas reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona, o que não ocorre nas paredes celulares de bactérias gram-negativas. As colônias isoladas das vinte bactérias foram inoculadas em meio semi-seletivo YMA e com a utilização da alça de repicagem esterilizada foram transferidas para uma lâmina de vidro limpa já acrescida de uma gota de NaCl 0,85%. A lâmina foi submetida ao processo de esfregaço em toda sua superfície seguido de fixação da amostra por secagem na chama de bico de Bunsen, garantindo assim uma fixação uniforme por toda a lâmina (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A sequência de coloração do esfregaço foi: cristal violeta (violeta de metila, 4g; oxalato de amônia, 4g; álcool etílico, 100 mL; álcool metílico, 100 mL; água

destilada, 600 mL) por 1 minuto; lavagem com água; solução de lugol (iodeto de potássio, 4,5g; iodo metálico, 3g; água destilada, 450 mL, lugol concentrado: água) por 1 minuto; lavagem com água; lavagem com etanol-acetona 1:1 (v:v) por 20 segundos; lavagem com água; solução de safranina (safranina, 2,5g; água destilada, 500mL) por 30 segundos; lavagem com água. Esse método foi realizado conforme descrito pelo Ministério da Saúde (2001).

Depois do método de coloração, foi realizada a secagem e lavagem da lâmina e a análise microscópica em objetiva com aumento de 100x, onde foi observada a forma das células bacterianas e a presença da coloração em tons rosa para as bactérias gram-negativas e violeta para as gram-positivas.

#### *4.2. Teste de Solubilização de Fosfato Inorgânico.*

O teste de solubilização do fosfato foi executado para determinar a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato pelo uso do meio sólido NBRYP (NAUTIYAL, 1999) contendo fosfato insolúvel. Os isolados foram incubados em triplicata a 28 °C por 15 dias observando em dias diferentes a presença ou ausência de halo ao redor das colônias indicativo ou não de solubilização do fosfato. Foi investigada também a capacidade de solubilização do fosfato dos isolados usando o meio Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948). Os isolados foram incubados a 28 °C durante 3 dias. Em seguida foi observada a presença/ausência de um halo transparente em volta das colônias. A presença do halo foi o indicativo da solubilização do fosfato.

#### *4.3. Teste de Citrato.*

O teste de citrato é utilizado para determinação da capacidade da bactéria em assimilar o citrato de sódio como única fonte de carbono e utilizá-lo para seu metabolismo e crescimento pela ação da enzima citrato liase. Os isolados bacterianos foram inoculados na forma de estrias na região superficial do meio sólido citrato de Simmons (TEIXEIRA, FERREIRA & SANTOS, 2012) e armazenados em estufa a 30 °C por 72 horas. Na análise das culturas no meio citrato foi observado o crescimento das bactérias na superfície do meio e também a coloração desse meio de cultura. Para identificar as bactérias como citrato positivo foi considerado a presença de crescimento e a detecção da coloração azul do meio que fica alcalinizado devido à degradação de citrato pela ação da enzima citrato liase. Para identificar as bactérias como citrato negativas foi considerado a ausência de crescimento e a manutenção do meio na cor verde (TEIXEIRA, FERREIRA & SANTOS, 2012).

#### *4.4. Teste de Urease.*

O teste de urease é usado para detecção da presença da enzima urease nos isolados quando estes são submetidos ao meio de cultura urease. A degradação da uréia é realizada pela ação da enzima urease e desse processo metabólico resulta a formação de produtos como o CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e amônia, que reagem formando carbonato de amônia, alcalinizando o meio de cultura. A avaliação das bactérias quanto à capacidade de degradação de uréia foi realizada utilizando o meio uréia (CHRISTENSEN, 2012). Os isolados bacterianos foram inoculados na forma de estrias na superfície do meio uréia e armazenados em estufa a 30 °C por 72 horas (IKEDA, 2010). A prova do teste é considerada positiva quando ocorre a alcalinização do meio devido a degradação da uréia, onde o meio passa a apresentar coloração rosa intenso, enquanto na prova negativa não há alteração

da cor do meio, que permanece alaranjado, ou pode-se observar a acidificação do meio indicado pela cor amarelo (UFBA, 2012; COGO, 2008).

#### *4.5. Teste de Protease.*

Para o teste de protease foi observada a capacidade de crescimento bacteriano em meio rico em proteína (HUNGRIA et al., 1994). A avaliação da atividade da enzima hidrolítica de proteínas do leite foi realizada a partir da observação do crescimento das colônias e a produção de um halo de translúcido característico para presença da enzima proteolítica. Para essa análise foi utilizado o meio de cultura mínimo sólido contendo proteína do leite (leite em pó 2%) (Anexo I). O crescimento foi avaliado por um período de 96 horas e o diâmetro da colônia e do halo foi mensurado com régua milimétrica. As bactérias que não apresentaram formação de halo foram avaliadas como negativas para assimilação da fonte de proteína.

A avaliação da ação da enzima proteolítica no meio protease foi realizada pelo estabelecimento da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, para gerar o índice enzimático (IE) (HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1975), onde o valor desse índice é diretamente proporcional a atuação enzimática.

#### *4.6. Teste de Catalase.*

Por meio deste teste é realizada a identificação da produção da enzima catalase pelas bactérias estudadas. A atividade metabólica desta enzima é caracterizada pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Foi utilizada alíquota de cada uma das vinte bactérias e das quatro estirpes

padrões que foi transferida para uma placa dividida em vinte e quatro quadrantes, de forma que todas as bactérias pudessem ser analisadas, e em seguida foi adicionado 50 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3%. Por esse método, a reação foi determinada pela formação de bolhas de oxigênio em até 2 minutos após a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultando teste positivo. Este teste foi realizado segundo Ikeda (2010).

## 5. Caracterização Molecular.

### 5.1. Extração do DNA.

Os vinte isolados e as quatro estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) tiveram seu DNA extraído conforme descrito por Ausebel, Brent e Kingston (1999), com modificações. Os isolados foram cultivados em frascos contendo 5 mL de meio líquido YMA e mantidos sob agitação de 140 rpm durante 24 horas à temperatura ambiente. Foram utilizados 3 mL de cultura desses microrganismos que foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 2 minutos e então adicionados 600 µL de solução de lise de DNA (50 µM Tris pH 7,6; 20 mM de EDTA; 400 mM de NaCl; 1% SDS) e incubados por 10 minutos a 80 °C. Posteriormente as amostras foram transferidas para o banho de gelo por 5 minutos e adicionado 3µL de solução RNase (20 µg.mL<sup>-1</sup>) e incubada a 37 °C por 15 minutos. A esta mistura, foram acrescentados 200 µL de NaCl 5M, e depois foi homogeneizada por inversão sendo acondicionada em banho de gelo por 5 minutos. A mistura foi submetida ao processo de centrifugação a 13.000 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo já contendo 600 µL de isopropanol (P.A.) a temperatura ambiente e levado ao banho de gelo por 10 minutos. A

mistura foi centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante descartado, em seguida ressuspensa em 600 µL de etanol 70% e centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos sendo o etanol descartado. Foi secado o precipitado à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, em seguida, ressuspensa em 30 µL água ultrapura estéril e estocado a -20 °C para ser utilizado em análises posteriores.

### *5.2. Análise do DNA Extraído e dos Fragmentos da PCR.*

A partir do método de eletroforese em gel de agarose foram realizadas as análises do DNA obtido nas extrações e nas amplificações por PCR. A determinação do perfil eletroforético do material genético foi realizada em gel de agarose 0,7% em tampão TBE 1X (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989) e tampão de corrida FSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, Ficoll® 20% em T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>) sendo adicionado às amostras de DNA na proporção de 7:3 (FSUDS: DNA). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X durante 40 minutos a 90 V.

Foi utilizado brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para corar o gel de agarose que foi lavado em água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação *MultiDoc-it*® (UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1kb DNA Ladder® (BIOLABS).

### *5.3. Caracterização Genética por Análise da Região BOX-PCR.*

Foi utilizado o *primer* BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACG-3') para a amplificação por PCR da região BOX presente nas bactérias. Este *primer* foi sintetizado pela *Invitrogen*® (Life Technologies).

Para amplificação foi utilizado o seguinte sistema de reação: água milli-Q estéril 13,4 µL; dNTPs (estoque com 10 mM de cada base) 0,4 µL; tampão de PCR 10X (HCl 100 mM; KCl 500 mM) 2 µL; MgCl<sub>2</sub> (50 mM) 1,2 µL; *primer* BOX A1R (10 pmol µL<sup>-1</sup>) 0,8 µL; Taq DNA polimerase *Invitrogen*® (5 U.µL<sup>-1</sup>) 0,2 µL; DNA (50 ng. µL<sup>-1</sup>) 2 µL, em um volume final de 20 µL.

Os ciclos utilizados para a amplificação foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 6 min; 30 ciclos de desnaturação (40 segundos a 90 °C), anelamento (1 minuto a 62 °C) e extensão (5 minutos a 72 °C); 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 15 minutos, com o uso do termociclador *Biocycler*® de acordo com Kaschuk e colaboradores (2006).

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese, corados e fotografados em documentador digital.

#### 5.4. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região Intergênica 16S-23S rRNA.

Esta região do DNA é bastante conservada apresentando regiões variáveis, sendo então utilizada em pesquisas de identificação microbiana, ao nível molecular. As amostras de DNA total foram submetidas à reação de PCR, visando amplificar a região intergênica que codifica sub-unidades ribossomais, de acordo com metodologia proposta por Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997). Os reagentes utilizados para a reação de PCR 16S-23S foram: água milli-Q estéril 13,4 µL; dNTPs (estoque com 10 mM de cada base) 0,4 µL; tampão de PCR 10X (HCl 100 mM; KCl 500 mM) 2 µL; MgCl<sub>2</sub> (50 mM) 1,2 µL;

oligonucleotídeo pHR (10 pmol.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0,4  $\mu\text{L}$ ; oligonucleotídeo p23 (10 pmol.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0,4  $\mu\text{L}$ ; DNA (50 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ; Taq DNA polimerase *Invitrogen*® (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0,2  $\mu\text{L}$ , em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ .

A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 28 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94 °C), anelamento (30 segundos a 62 °C) e extensão (40 segundos a 72 °C); 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos, com o uso do termociclador *Biocycler*®.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese, corados e fotografados em documentador digital.

## 5.5. Caracterização Genética por Análise da Região 16S rDNA.

### 5.5.1. Amplificação do Gene 16S rDNA.

Foi realizada a amplificação do gene 16S rDNA presente no material genético extraído das bactérias selecionadas utilizando os *primers* Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGG -3') e o Y3 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTC-3') (CHUEIRE et al., 2003).

Os reagentes utilizados para reação de amplificação foram: água milli-Q estéril 13,4  $\mu\text{L}$ ; dNTPs (estoque com 10 mM de cada base) 0,4  $\mu\text{L}$ ; tampão de PCR 10X (HCl 100 mM; KCl 500 mM) 2  $\mu\text{L}$ ; MgCl<sub>2</sub> (50 mM) 1,2  $\mu\text{L}$ ; oligonucleotídeo Y1 (10 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0,4  $\mu\text{L}$ ; oligonucleotídeo Y3 (10 pmol. $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0,4  $\mu\text{L}$ ; DNA (50 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ; Taq DNA polimerase *Invitrogen*® (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 0,2  $\mu\text{L}$ , em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ .

Foi realizada a amplificação usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 28 ciclos de desnaturação (1 minuto



a 94 °C), anelamento (30 segundos a 62 °C) e extensão (40 segundos a 72 °C); 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 5 minutos, com o uso do termociclador *Biocycler*®.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese, corados e fotografados em documentador digital.

#### 5.5.2. *Análise de Restrição dos Fragmentos da Região 16S Amplificados por PCR.*

Os fragmentos amplificados por PCR obtidos da região 16S foram avaliados pela técnica de ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis*) que consiste na utilização de enzimas de restrição com padrões de corte diferentes para observar diferentes sequências do gene 16S sendo os dados obtidos utilizados para as análises de similaridade. Assim, cada produto de PCR foi submetido ao corte com três enzimas de restrição: *Hae*III (reconhece 5'...GG↓CC... 3'nucleotídeos), *Afa*I (reconhece 5'... GT↓AC... 3' nucleotídeos) e *Alu*I (reconhece 5'...AG↓CT...3' nucleotídeos). Neste procedimento, 0,5 µL do fragmento de 16S rDNA amplificado foi digerido com as endonucleases separadamente, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a digestão, o padrão de bandas foi visualizado por eletroforese em gel de agarose (2,5%), em tampão TBE 1X por 1 h a 90 V, juntamente com o marcador de peso molecular DNA 100 pb (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>), sendo em seguida fotografado em fotodocumentador *MultiDoc-it*® (UVP).

#### 5.6. *Análise dos Dados.*

A partir dos fragmentos obtidos por amplificação, foi construída uma matriz binária (0 e 1), com os dados obtidos da análise dos fragmentos amplificados para a região BOX, intergênica 16S-23S e para os fragmentos de restrição. Para cada posição de migração dos fragmentos foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de fragmento. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Os valores gerados para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard, onde  $J = a/(n-d)$ , sendo “a” o número de combinações com a presença dos fragmentos, menos as combinações de ausência dos fragmentos, “d” é o número de combinações de ausência de fragmentos e “n” é o número de combinações possíveis. Para estas análises foi utilizado o software NTSYSpc® (versão 2.02i ,1986-1998 Applied Biostatistics) que gerou um dendrograma de similaridade entre as bactérias analisadas, permitindo avaliar a diversidade dos isolados.

O uso do software VisionWorksLS (versão: 6.3.3, 2007) do fotodocumentador digital permitiu a análise dos fragmentos da amplificação, estimando seus valores em pares de bases, comparados ao padrão 1kb DNA Ladder® quando se analisou da região BOX, intergênica 16S-23S rRNA e gene 16S, e 100pb DNA Ladder® quando se analisou os fragmentos de restrição. Estes valores foram dispostos em tabela para avaliação da presença e disposição dos fragmentos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### *1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas.*

A partir das caracterizações morfológicas, foi observado que as colônias isoladas apresentaram algumas características em comum como formas circulares, superfícies lisas e a presença de brilho. Estas características não foram utilizadas para análise de agrupamento por não representar dados que permitissem distinção em mais grupos. Foi possível distinguir aspectos morfológicos quando as colônias foram analisadas quanto aos critérios de tamanho, borda, consistência, transparência, coloração e elevação. Foi constatado que os maiores valores de frequência das variações morfológicas obedecem a seguinte ordem decrescente: 87,50% das colônias apresentaram tamanho grande, 79,16% borda lisa, 66,66% consistência viscosa, 66,66% transparentes, 62,50% coloração amarelo creme e 50,00% elevação média (Tabela 1).

**Tabela 1:** Características morfológicas de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência, a partir da observação das colônias em meio sólido YMA.

<b>Bactérias</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Borda</b>	<b>Consistência</b>	<b>Transparência</b>	<b>Coloração</b>	<b>Elevação</b>
<b>MT8</b>	GR	LI	VI	TR	AC	AL
<b>MT10</b>	PU	LI	VI	TR	AC	AL
<b>MT13</b>	PU	ON	VI	TR	AC	ME
<b>MT14</b>	PU	LI	VI	TR	AC	AL
<b>MT22</b>	PU	LI	CR	LE	AO	BA
<b>MT23</b>	PU	LI	VI	TR	AC	ME
<b>MT26</b>	PU	LI	VI	TR	AC	ME
<b>MT29</b>	PU	ON	VI	TR	AC	ME
<b>MT30</b>	PU	LI	VI	TR	AC	ME
<b>MT31</b>	PU	LI	VI	TR	AC	ME
<b>MT39</b>	GR	LI	VI	TR	CRE	BA
<b>MT40</b>	PU	LI	CR	LE	AO	BA
<b>MT41</b>	PU	ON	CR	LE	AO	BA
<b>MT42</b>	PU	LI	CR	LE	AO	BA
<b>MT43</b>	PU	LI	VI	TR	AC	ME
<b>MT45</b>	PU	LI	VI	TR	AC	ME
<b>MT51</b>	PU	ON	VI	TR	AC	ME
<b>MT70</b>	PU	ON	VI	TR	AC	ME
<b>MT74</b>	PU	LI	VI	TR	AC	ME
<b>MT75</b>	PU	LI	VI	TR	AC	AL
<b>SEMIA 5079</b>	PU	LI	CR	LE	AO	BA
<b>SEMIA 6161</b>	GR	LI	CR	LE	CRE	BA
<b>SEMIA 4077</b>	PU	LI	CR	LE	AO	ME
<b>SEMIA 3012</b>	PU	LI	CR	LE	AO	BA

PU: Puntiforme (< 5 mm), GR: Grande (> 5 mm), ON: Ondulada, LI: Lisa, VI: Viscosa, CR: Cremosa, TR: Transparente, LE: Leitosa, AC: Amarelo Creme, AO: Amarelo Ouro, CRE: Creme, AL: Alta, ME: Média, BA: Baixa. Estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).

Pereira e Brasil (2008) observaram, em seu estudo com rizóbios, que foi possível atribuir várias características as colônias bacterianas avaliadas. Em relação à forma destacou desde cúpula, cônica ou achatada, e apresentaram tamanhos variados, desde pequeno, médio ou grande, e em relação à consistência foram observadas colônias viscosas e secas. Estirpes de rizóbios que produzem muito muco, com elasticidade, aparência homogênea e viscosa também foram identificadas por Moreira & Siqueira (2006).

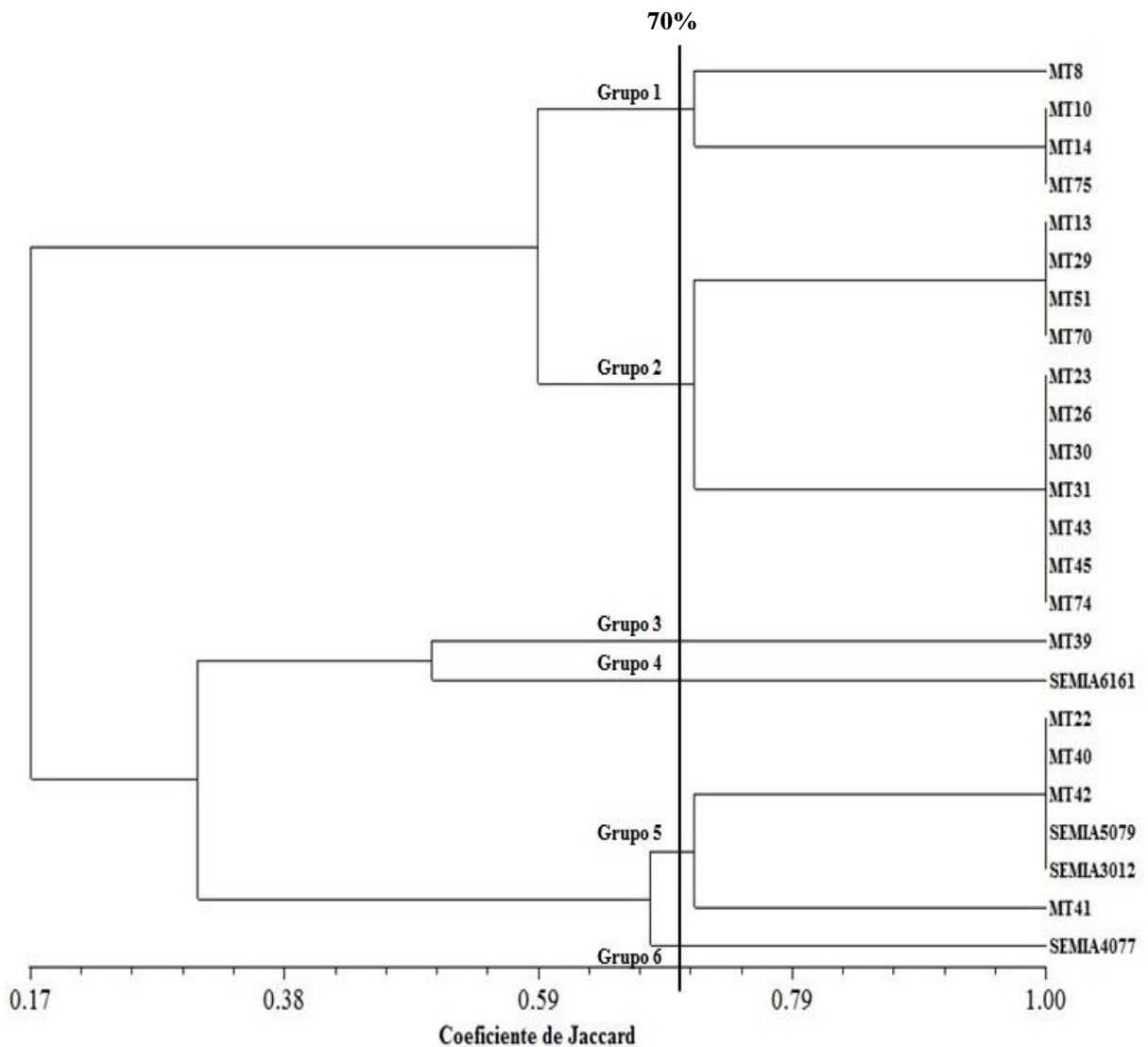
Hungria (1994) observou que em rizóbios a viscosidade é uma característica de isolados tanto de crescimento lento como rápido, apresentando variações intrínsecas, como por exemplo, pouca, média e muita elasticidade do muco produzido. Para Coutinho e colaboradores (1999) a produção de muco pode representar um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios, em diferentes condições edafo-climáticas.

Foi observado por Somasegaran e Hoben (1985) que bactérias do gênero *Rhizobium* quando submetidas ao meio de cultura adequado geralmente formam colônias que apresentam coloração branca ou bege, de forma circular ou convexa, semi-translúcidas ou opacas, mucilaginosas e geralmente com diâmetro medindo entre 2 a 4 mm quando avaliadas entre 3 a 5 dias de incubação.

Já Méndez (2004) ao estudar 40 isolados selecionados observou que estes apresentavam características morfológicas típicas de *Rhizobium*, onde em todas as colônias foi identificada a coloração amarela e tamanho de diâmetro variando entre 3 a 6 mm. A maioria apresentou bordas regulares, presença de mucosa e elevação alta.

O dendograma obtido a partir dos dados da Tabela 1 permitiu a formação de 6 grupos, demonstrando a variabilidade morfológica existente entre as

bactérias estudadas (Figura 1). Ainda esses grupos apresentaram mais de 70% de similaridade, revelando assim características morfológicas comuns aos indivíduos que formaram cada grupamento. Nesse estudo, algumas amostras apresentaram consideráveis graus de semelhanças morfológicas em relação às estirpes padrões conhecidas do grupo dos rizóbios: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) como mostra o dendrograma obtido a partir dos dados morfológicos (Figura 1).



**Figura 1:** Dendrograma de similaridade utilizando os dados das caracterizações morfológicas de 20 bactérias isoladas de raízes de plantas de milho e 4 estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*). O agrupamento das bactérias foi realizado por meio do programa NTSYS utilizando o coeficiente de Jaccard.

O grupo 1 foi formado pelos isolados MT8, MT10, MT14 e MT75. Já o grupo 2 formou o maior grupamento contendo quase 50% das bactérias estudadas, apresentando os isolados MT13, MT29, MT51, MT70, MT23, MT26, MT30, MT31, MT43, MT45 e MT74 (Figura 1). O isolado MT39 e as estirpes de referência SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*) e SEMIA 4077 (*Rhizobium*

*tropici*) formaram grupamentos isolados correspondendo cada um respectivamente aos grupos 3, 4 e 6. O grupo 5 foi composto pelos isolados MT22, MT40 e MT42, bem como pelas estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*), o que indica a existência de similaridades morfológicas entre estes isolados e as bactérias já conhecidas (Figura 1).

Esses resultados levam a inferir que há relações morfológicas entre os isolados e entre alguns destes com as estirpes pertencentes ao grupo dos rizóbios, revelando dados que podem ser agregados ao processo de caracterização das bactérias estudadas.

As características morfológicas revelam uma grande diversidade de populações de bactérias do gênero *Rhizobium*, e que geralmente estão relacionadas com os estudos moleculares (HAMEED et al., 2004).

Para confirmar a similaridade e a posição taxonômica dos isolados analisados neste trabalho, faz-se necessário estudá-los geneticamente.

## *2. Teste de Crescimento em Fonte de Carbono.*

Para este teste, foi observado que todos os isolados cresceram em todas as fontes de carbono fornecidas, exceto na fonte de ácido maleico. Isso demonstra que as bactérias estudadas apresentam grande diversidade metabólica e similaridades fisiológicas na utilização das fontes de carbono entre si e com as estirpes referência de rizóbios utilizadas nesse trabalho (Anexo III).

Pesquisas mostram que as bactérias do gênero *Rhizobium* são capazes de utilizar uma grande quantidade de produtos como fontes de carbono. A literatura cita cultivos com glicose, galactose, frutose, arabinose, xilose, ramnose, maltose,



sacarose, lactose, trealose, rafinose, manitol, furamato, malato, succinato, citrato e piruvato (JORDAN, 1984). De modo semelhante, os isolados estudados nesse trabalho também cresceram nas fontes de carbono glicose, frutose, arabinose sacarose e manitol, apresentando essas características em comum com rizóbios.

Somasegaran e Hoben (1985) identificaram que rizóbios crescem bem em meios de cultura contendo uma fonte de carbono como manitol ou glucose, ou de nitrato de amônio e outros sais inorgânicos.

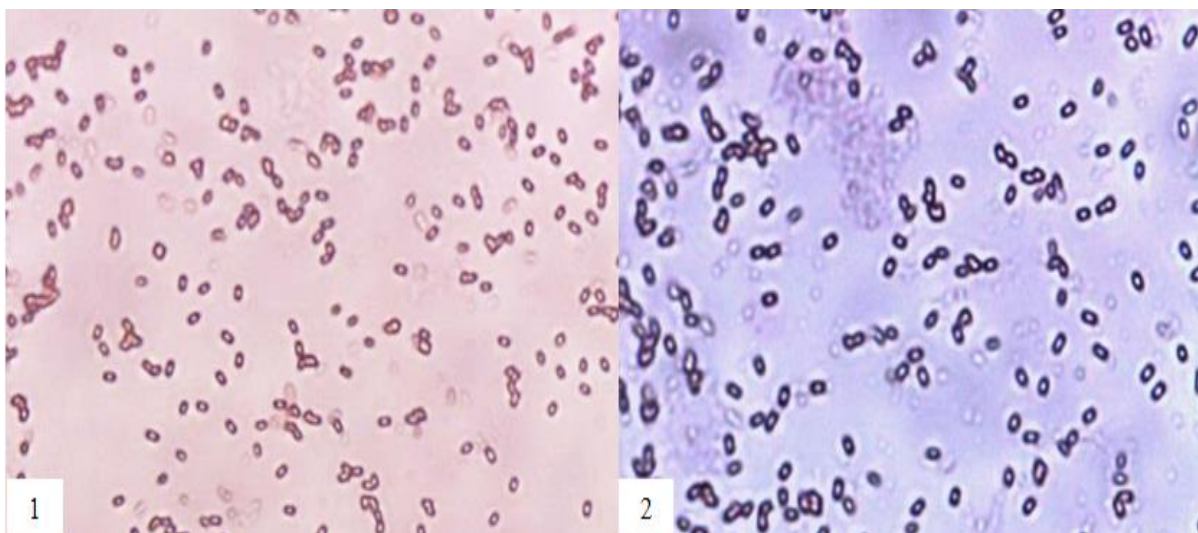
Por outro lado, Berges e colaboradores (2009) observaram que isolados de rizóbio normalmente apresentam baixa capacidade para metabolizar fontes de carbono pertencentes ao grupo químico dos ácidos, como ácido málico, fato também observado nesse estudo nas 4 estirpes referência e nos 20 isolados de milho testados (Anexo III).

Em seus estudos envolvendo a determinação do perfil fisiológico de microrganismos, Sridhar e colaboradores (2005) também observaram que as fontes de carbono que mais limitaram o crescimento de bactérias isoladas de nódulos de adubo verde foram as que apresentavam natureza química ácida. Fernandes Júnior e colaboradores (2009) em sua pesquisa realizada com bactérias isoladas de nódulos de guandu verificaram que o ácido málico e a maltose representavam as fontes de açúcar com menor índice de metabolização pelos isolados avaliados.

A capacidade de metabolizar uma variedade de fontes de carbono por microrganismos representa uma vantagem ecológica. Assim, os isolados que utilizam as mais variadas formas de carbono, que as plantas secretam para a rizosfera, apresentam uma importante característica de interesse agrícola, pois revela a capacidade saprofítica que podem ter para se estabelecer no solo, assim podem ser selecionados para produção de bioinoculantes (LEITE, 2011).

### 3. Coloração de Gram.

Por meio do teste de coloração gram, foi possível discriminar a forma das 24 bactérias estudadas como bastonete. Em 25% destas bactérias (MT8, MT10, MT22, MT23, MT26, e MT41) foi observada a coloração violeta, aspecto que determina as bactérias gram-positivas e 75% (MT13, MT14, MT29, MT30, MT31, MT39, MT42, MT43, MT45, MT51, MT70, MT74, MT75, SEMIA 5079, SEMIA 6161, SEMIA 4077 e SEMIA 3012) apresentou coloração rosada característica de bactéria gram-negativa (Figura 2).



**Figura 2:** Coloração de gram em objetiva de imersão (100x) de bactérias gram positivas e gram negativas de bactérias isoladas de raízes de plantas de milho. (1): MT13 bacilo gram-negativo; (2): MT8 bacilo gram-positivo.

Nesse trabalho, foi possível observar que as estirpes de referência pertencentes ao grupo do rizóbios utilizadas como controle nessa pesquisa foram identificadas como gram-negativas juntamente com 70% dos 20 isolados estudados, indicando similaridades entre essas bactérias.

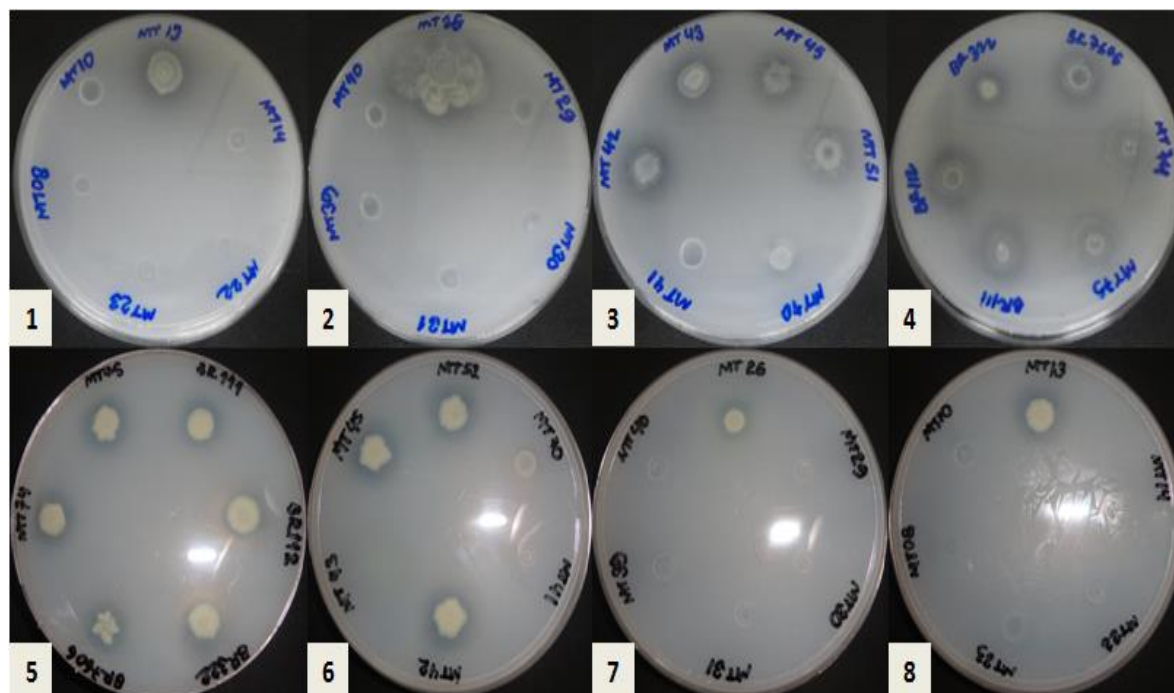
Somasegaran e Hoben (1985) e Garrity e Holt (2001) descrevem bactérias do gênero *Rhizobium* como bacilos aeróbicos, gram-negativos não formadores de esporos e com tamanho que medem em torno de 0,5 µm.

Méndez (2004) em seu estudo com 40 isolados também caracterizou bactérias do gênero *Rhizobium* como gram-negativas móveis, o que contribui para hipótese de que a maioria das bactérias investigadas nesse trabalho apresenta similaridades com bactérias do gênero *Rhizobium* quanto à composição das paredes celulares das bactérias com retenção do corante cristal violeta.

Deste modo, os isolados que foram considerados gram positivos (MT8, MT10, MT22, MT23, MT26, e MT41) possivelmente não pertencem ao grupo dos rizóbios.

#### *4. Teste de Solubilização de Fosfato Inorgânico.*

Por meio do teste de solubilização de fosfato inorgânico foi observado que 50% das bactérias estudadas apresentaram algum nível de solubilização de fosfato tanto no meio NBRIP quanto no meio Pikovskaya. A solubilização foi detectada pela formação do halo de degradação ao redor das colônias no meio contendo fosfato (Figura 3).



**Figura 3:** Formação de halo de degradação observado em meio sólido NBRIP (1, 2, 3 e 4) e Pikovskaya (5, 6, 7 e 8) para os isolados positivos. Bactérias: 1- Isolado MT13; 2- Isolado MT26; 3- Isolados MT42, MT43, MT45 e MT51; 4- Isolados MT74, MT75, Estirpes Referências SEMIA 5079, SEMIA 6161, SEMIA 4077 e SEMIA 3012; 5- Isolados MT74, MT75, Estirpes Referências SEMIA 5079, SEMIA 6161, SEMIA 4077 e SEMIA 3012; 6 - Isolados MT42, MT45, MT51 e MT70; 7- Isolado MT26; 8- Isolado MT13.

Foi mensurado o diâmetro do halo da colônia e calculado o índice de solubilização (IS) por meio da razão entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia (BERRAQUEIRO et al., 1976) (Tabela 2).

Comparando as médias dos IS entre os isolados em ambos os meios avaliados, foi observado que houve maiores IS de solubilização no meio Pikovskaya com média de igual a 1,73 enquanto no meio NBIP a média foi de 1,29. Comparando esses dados com as médias dos IS das estirpes, foi observado

que no meio Pikovskaya também houve maior IS em relação aos isolados, sendo o valor igual a 1,75 para este meio e 1,44 para o meio NBRIP (Tabela 2).

O isolado MT43 apresentou o maior IS e os isolados MT26 e MT45 os menores no meio NBRIP. Já no meio Pikovskaya os isolados MT70 e MT45 apresentaram o menor e o maior valor respectivamente (Tabela 2).

Foi observado que o isolado MT70 apresentou formação de halo de degradação no meio Pikovskaya (IS = 1,33), no entanto não promoveu solubilização no meio NBRIP (Tabela 2). De forma oposta, o isolado MT43 formou halo de degradação no meio NBRIP (IS = 1,57) e não apresentou solubilização no meio Pikovskaya. Esse comportamento pode indicar que esses isolados apresentam adaptações específicas quanto à utilização de fosfato inorgânico.

**Tabela 2:** Média e desvio padrão do Índice de Solubilização (IS) obtido pela razão diâmetro do halo de degradação/diâmetro da colônia observado nos isolados que cresceram nos meios NBRIP e Pikovskaya.

<b>Bactérias</b>	<b>Meio NBRIP (IS)</b>	<b>Meio Pikovskaya (IS)</b>
<b>MT13</b>	1,43 ( $\pm$ 0,05)	1,45 ( $\pm$ 0,07)
<b>MT26</b>	1,14 ( $\pm$ 0,01)	1,83 ( $\pm$ 0,17)
<b>MT42</b>	1,46 ( $\pm$ 0,05)	1,84 ( $\pm$ 0,06)
<b>MT43</b>	1,57 ( $\pm$ 0,11)	-
<b>MT45</b>	1,14 ( $\pm$ 0,05)	2,00 ( $\pm$ 0,12)
<b>MT51</b>	1,21 ( $\pm$ 0,05)	1,74 ( $\pm$ 0,12)
<b>MT70</b>	-	1,33 ( $\pm$ 0,01)
<b>MT74</b>	1,18 ( $\pm$ 0,05)	1,87 ( $\pm$ 0,12)
<b>MT75</b>	1,21 ( $\pm$ 0,05)	1,79 ( $\pm$ 0,06)
<b>SEMIA 5079</b>	1,43 ( $\pm$ 0,05)	1,80 ( $\pm$ 0,21)
<b>SEMIA 6161</b>	1,28 ( $\pm$ 0,05)	1,66 ( $\pm$ 0,05)
<b>SEMIA 4077</b>	1,77 ( $\pm$ 0,19)	1,71 ( $\pm$ 0,14)
<b>SEMIA 3012</b>	1,29 ( $\pm$ 0,05)	1,85 ( $\pm$ 0,14)

(-) = Não formou halo de degradação no meio; (IS) = Índice de Solubilização de Fosfato. Estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).

Silva Filho & Vidor (2000) descrevem que a solubilização pode ser classificada em baixa solubilização ( $IS < 2$ ), média solubilização ( $2 < IS < 3$ ) e alta solubilização ( $IS > 3$ ). De acordo com essa classificação, todos os isolados analisados nesse estudo apresentaram baixa solubilização, mas apresentando, portanto, algum nível de produção de enzimas de solubilização de fosfato (Tabela 2).

Saravanan e colaboradores (2007) descreveram que a presença de zona clara ou zona de solubilização ao redor da colônia está relacionada com a excreção de ácidos orgânicos no meio de cultura, o qual acidifica o meio e contribui para a solubilização de nutrientes.

O estudo de bactérias solubilizadoras de fosfato é muito importante pois o fósforo é um elemento muito importante para o crescimento vegetal e sua baixa disponibilidade nos solos aumenta a relevância das rizobactérias solubilizadoras do fosfato inorgânico. Estes microorganismos solubilizam o fosfato através da liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (BANO E MUSSARAT, 2003).

Foi verificado por Silva-Filho & Vidor (2000) que microorganismos solubilizadores de fosfatos inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas. Isso tem gerado grande interesse na utilização desses microorganismos como inoculante comercial, ou a utilização de suas populações como forma de promover uma melhor utilização do P existente no solo, ou adicionado como fertilizante.

Em estudos com rizóbios, foi observado por Antoun e colaboradores (1998) que a frequência de estirpes de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* capazes de solubilizar o fosfato é reduzida (2-5%) ao contrario das estirpes de *R. leguminosarum* *bv. viciae*, *bv. phaseoli* e *Sinorhizobium meliloti* onde 67-84% das estirpes solubilizaram fosfato.

Foram testados por Chabot e colaboradores (1996) microorganismos solubilizadores de fosfato, como *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminosarum*, afim de verificar seu potencial como RPCPs em alface e milho. O processo de solubilização de fosfato desempenhado por essas bactérias foi evidenciado como um mecanismo importante para a promoção de crescimento

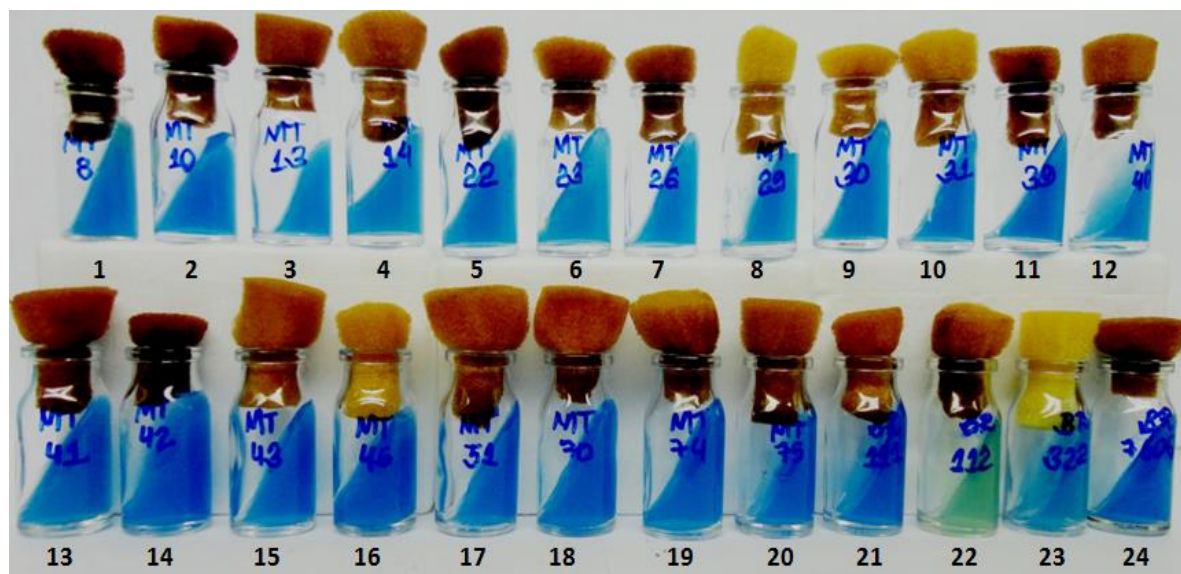
da planta em um solo moderadamente fértil e em outro muito fértil, devido o aumento da disponibilidade de fósforo. Ao final da avaliação do estudo, os pesquisadores constataram que o rizóbio apresentou maior eficiência na promoção de crescimento, ainda que bactérias desse grupo sejam estudadas como fixadoras simbióticas de nitrogênio em leguminosas.

Muitos autores têm analisado a variação no potencial de solubilização de microrganismos e isso tem sido utilizado como uma das principais características no processo de seleção de bactérias para produção de inoculantes (SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

#### 5. *Teste de Citrato.*

Para o teste de citrato (Figura 4) todas as 20 bactérias estudadas e 3 estirpes de referência (SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*)) apresentaram atividade da enzima citrato liase, sendo caracterizadas como citrato positivas. Somente a estirpe referência SEMIA 6161 (*Sinorhizobium fredii*) foi caracterizada como citrato negativo, devido a incapacidade de utilizar o citrato como única fonte de carbono, mantendo o pH do meio neutro (verde).





**Figura 4:** Identificação da atividade de citrato liase das bactérias isoladas de milho em meio de cultura sólido Citrato de Simmons. (+) cor azul e (-) cor verde. Bactérias: 1- Isolado MT8; 2- Isolado MT10; 3- Isolado MT13; 4- Isolado MT14; 5- Isolado MT22; 6- Isolado MT23; 7- Isolado MT26; 8- Isolado MT29; 9- Isolado MT30; 10- Isolado MT31; 11- Isolado MT39; 12- Isolado MT40; 13- Isolado MT41; 14- Isolado MT42; 15- Isolado MT43; 16- Isolado MT45; 17- Isolado MT51; 18- Isolado MT70; 19- Isolado MT74; 20- Isolado MT75; 21- Estirpe SEMIA 5079; 22- Estirpe SEMIA 6161; 23- Estirpe SEMIA 4077; 24- Estirpe SEMIA 3012.

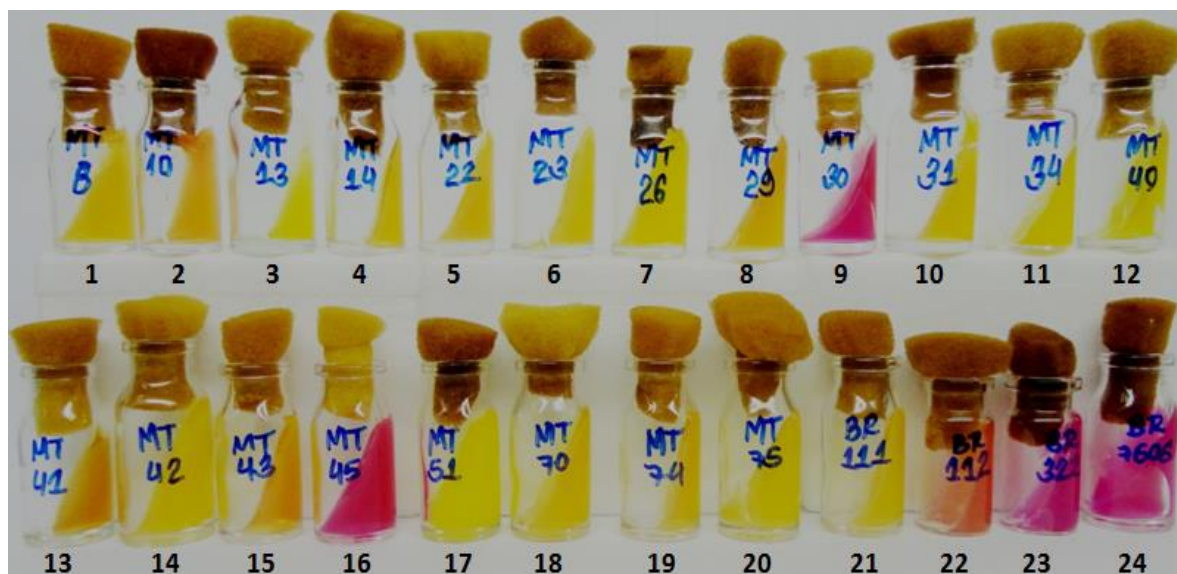
Teixeira, Ferreira & Santos (2013) relatam que a presença da enzima citrato liase em isolados, permite a utilização do citrato como fonte de carbono pela bactéria, assim, no meio intracelular ocorre a degradação do citrato e a produção de oxaloacetato e acetil-CoA. Estes produtos se combinam com o sódio fornecido pelo citrato de sódio, e ocorre a alcalinização do meio de cultura bem como a alteração da coloração do meio de verde para azul.

Jordam (1984) descreve que as bactérias do gênero *Rhizobium* são capazes de utilizar uma ampla gama de produtos como fontes de carbono entre as quais está o citrato. Esse resultado também foi constatado para os 20 isolados e 3 estirpes referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 4077

(*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) avaliadas nesse trabalho.

#### 6. Teste de Urease.

Após a execução do teste de urease (Figura 5) foi observado que os isolados MT30 e MT45, bem como as estirpes referência SEMIA 6161 (*Sinorhizobium fredii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*), apresentaram atividade da enzima urease, uma vez que houve a alteração da coloração do meio de alaranjado para rosa intenso. Os demais isolados foram identificados como urease negativo, já que não apresentaram coloração rosa intenso e sim coloração amarelo intenso, o que provavelmente é resultado da liberação de metabólitos de caráter ácido no meio.



**Figura 5:** Identificação da atividade de urease das bactérias isoladas de milho em meio de cultura sólido Uréia Base. (+) rosa e (-) amarelo. Bactérias: 1- Isolado MT8; 2- Isolado MT10; 3- Isolado MT13; 4- Isolado MT14; 5- Isolado MT22; 6- Isolado MT23; 7- Isolado MT26; 8- Isolado MT29; 9- Isolado MT30; 10- Isolado MT31; 11- Isolado MT39; 12- Isolado MT40; 13- Isolado MT41; 14- Isolado MT42; 15- Isolado MT43; 16- Isolado MT45; 17- Isolado MT51; 18- Isolado MT70; 19- Isolado MT74; 20- Isolado MT75; 21- Estirpe SEMIA 5079; 22- Estirpe SEMIA 6161; 23- Estirpe SEMIA 4077; 24- Estirpe SEMIA 3012.

Cogo (2008) descreve que a molécula de uréia ao sofrer a ação da enzima urease, provoca o acúmulo de moléculas de amônia e dióxido de carbono no meio de cultura resultando na alcalinização do meio devido o aumento de pH.

Pesquisas demonstram que a enzima urease é freqüentemente encontrada em bactérias do solo. Ao estudar variados tipos de solo, Lloyd & Sheaffe (1973) observaram que 30% dos isolados apresentaram a atividade da enzima urease.

Segundo Jensen & Schroeder (1965) bactérias do gênero *Rhizobium* já foram identificadas pela capacidade de utilizar de uréia como fonte de nitrogênio, o que indica a produção de urease por esses microorganismos. Entre as estirpes de rizóbios que apresenta essa capacidade foram idenficadas as

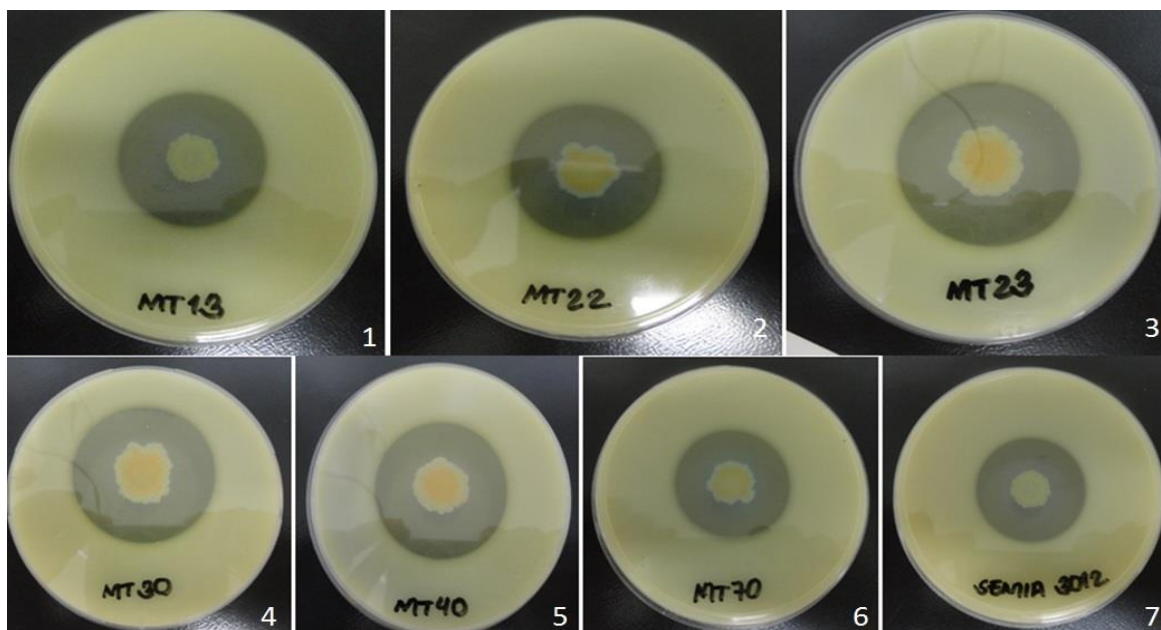
espécies *Rhizobium leguminosarum* (JENSEN & SCHROEDER, 1965) e *Sinorhizobium meliloti* (MIKSCH & EBERHARDT, 1994).

Esses resultados corroboram com os observados nesse estudo para a estirpe referência SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) e também permitem aferir que os isolados identificados como urease positivos (MT30 e MT45) apresentam similaridades bioquímicas com rizóbios quanto à capacidade de utilização da uréia como fonte de nitrogênio.

Em estudos recentes, foi realizada a caracterização de um grupo de genes ureolíticos de *R. leguminosarum*-UPM 791 bv. *viciae* (TOFFANIN et al., 2002). Isso mostra as características fenotípicas apontam para estudos de genes, que estão envolvidos na produção de enzimas desta via, sendo um processo importante para caracterização bioquímica e genética de microrganismos do solo.

#### 7. *Teste de Protease.*

Pela avaliação do teste de protease em meio acrescido de proteína do leite foi verificado que 7 dos isolados observados (MT13, MT22, MT23, MT30, MT40, MT70 e SEMIA 3012) apresentaram formação de halo de degradação indicativo da produção de enzima proteolítica (Figura 6). As demais bactérias, 17 isolados, apresentaram crescimento no meio protease, porém não formaram halo de degradação em volta da colônia bacteriana.



**Figura 6:** Formação de halo de degradação proteolítica observado em meio mínimo sólido acrescido de proteínas do leite 42% para os isolados positivos. Bactérias: 1- Isolado MT30; 2 - Isolado MT22; 3 - Isolado MT13; 4 - Isolado MT70; 5 - Isolado MT13; 6 - Estirpe SEMIA 3012; 7 - Isolado MT40.

Um dos parâmetros semi quantitativos mais utilizados para se avaliar a capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio sólido é índice de atividade enzimática (IE). Stamford e colaboradores (1998) recomendam um  $IE \geq 2,0$  para considerar um microrganismo produtor de enzimas em meio sólido. Já Vieira (1999) sugere que isolados que apresentam o índice enzimático com valor igual ou maior que 1,0 são considerados promissores para a produção enzimática.

De acordo com essas recomendações, todos os isolados que formaram halo de degradação no meio protease se enquadraram dentro desses parâmetros. O isolado MT40 foi a que apresentou maior índice enzimático (3,44), indicando maior produção de enzimas proteolíticas e o isolado MT13 juntamente com a estirpe SEMIA 3012 (*R. leguminosarum*) apresentaram os menores índices de 1,4 (Tabela 3).

**Tabela 3:** Média e desvio padrão do índice enzimático (IE) obtido pela razão entre o diâmetro do halo de degradação/diâmetro da colônia observado nos isolados no meio protease.

<b>Bactérias</b>	<b>Meio Protease (IE)</b>
<b>MT13</b>	1,41 ( $\pm$ 0,08)
<b>MT22</b>	2,00 ( $\pm$ 0,10)
<b>MT23</b>	3,16 ( $\pm$ 0,18)
<b>MT30</b>	2,87 ( $\pm$ 0,03)
<b>MT40</b>	3,44 ( $\pm$ 0,21)
<b>MT70</b>	2,09 ( $\pm$ 0,03)
<b>SEMIA 3012</b>	1,40 ( $\pm$ 0,05)

(IE) = Índice Enzimático; Estirpe Referência: SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).

Martinez-Molina (1979) e Glenn e Dilworth (1981) em seus estudos com microorganismos verificaram que estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium* formaram halos de degradação em meio protease e quando avaliadas apresentaram bons índices enzimáticos e que portanto foram identificadas como boas fontes de proteases. Esses resultados corroboram com os observados nesse estudo para as 7 amostras que apresentaram halo de degradação no meio extracelular (Tabela 3).

As enzimas proteolíticas são encontradas em vários microrganismos, como as bactérias. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas, têm levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos representam

uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (BEYNOM et al., 1989).

Na interação planta-bactéria, Landi e colaboradores (2006) afirma que a qualidade e a quantidade de exsudatos radiculares, bem como a morfologia radicular, variável entre as espécies vegetais, tem grande influência sobre as propriedades microbiológicas da rizosfera podendo resultar entre outros fatores, no estímulo da produção de enzimas proteolíticas, através da exsudação de metabólitos.

#### 8. *Teste de Catalase.*

Para o teste de catalase foram obtidos resultados positivos para 10 isolados (MT10, MT13, MT22, MT23, MT30, MT31, MT39, MT40, MT42 e MT70) e para as estirpes de referência SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) e SEMIA 6161 (*Sinorhizobium fredii*). As demais bactérias apresentaram resultados negativos.

A produção dessa enzima pode compor o conjunto de dados para seleção de isolados. Silva (2010) descreve que bactérias que apresentam a enzima catalase podem resistir à oxidação causada pelos metabólitos tóxicos do oxigênio (espécies reativas de oxigênio), o que relaciona esse fato a possíveis mecanismos envolvidos na proteção do microrganismo. Assim, pode se inferir que isolados bacterianos que produzem catalase como componente de sua maquinaria metabólica dispõem de vantagem adaptativa em relação às demais.

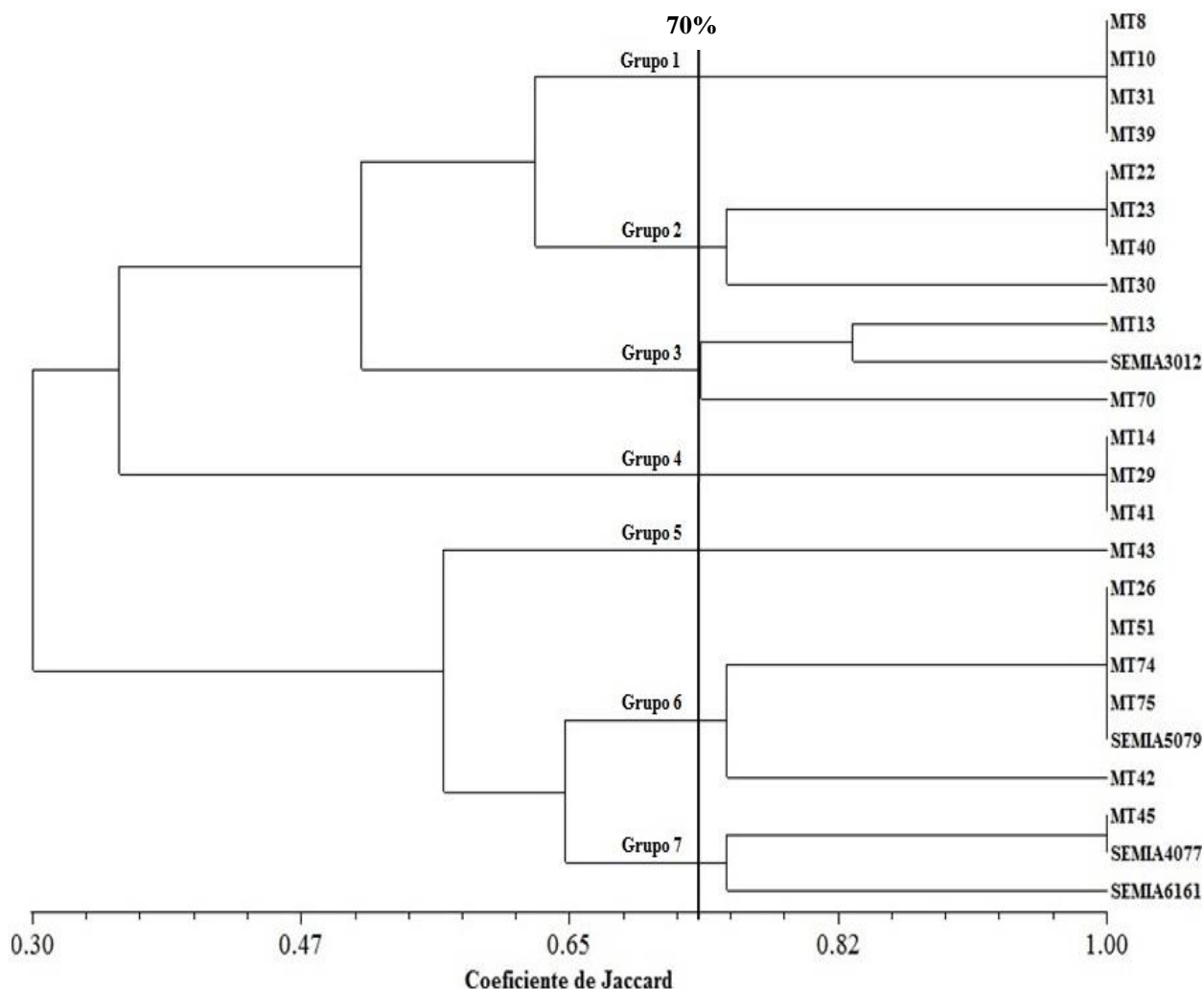
Marin e colaboradores (1999) relatam que dentro do gênero *Sinorhizobium* as espécies *S. meliloti*, *S. fredii*, *S. saheli*, *S. teranga* e *S. medicae* são todas produtoras de citocromo oxidase e catalase. Essa informação condiz

com a observação nesse estudo para detecção de catalase em relação a estirpe referência SEMIA 6161 (*Sinorhizobium fredii*) e 50% dos isolados estudados.

A partir da análise dos dados obtidos das características bioquímicas (coloração de gram, solubilização de fosfato inorgânico e testes de protease, urease, citrato e catalase) foi gerado um dendrograma (Figura 7) que permitiu a o agrupamento das bactérias estudadas em 7 grupos que apresentaram similaridades superiores a 70%.

O grupo 1 foi formado pelos isolados MT8, MT10, MT31 e MT39 enquanto o grupo 2 apresentou os isolados MT22, MT23, MT40 e MT30. Já o grupo 3 apresentou os isolados MT30 e MT70 agrupados com a estirpe de referência SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) (Figura 7). O grupo 4 foi composto pelos isolados MT14, MT29 e MT41 e o grupo 5 apresentou somente o isolado MT43 o que indica um distanciamento desse isolado das demais bactérias quanto as características bioquímicas. O grupo 6 apresentou os isolados MT26, MT51, MT74, MT75 e MT42 agrupados com a estirpe de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) (Figura 7). Já o grupo 7 apresentou o isolado MT45 agrupado com as estirpes de referência SEMIA 6161 (*Sinorhizobium fredii*) e SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*). Os grupamentos formados somente por isolados, e os formados por isolados e estirpes de referência, mostram que há semelhanças bioquímicas entre estes, e ainda a formação de 7 grupos distintos, indica a existência de diversidade bioquímica entre todas as bactérias estudadas (Figura 7).



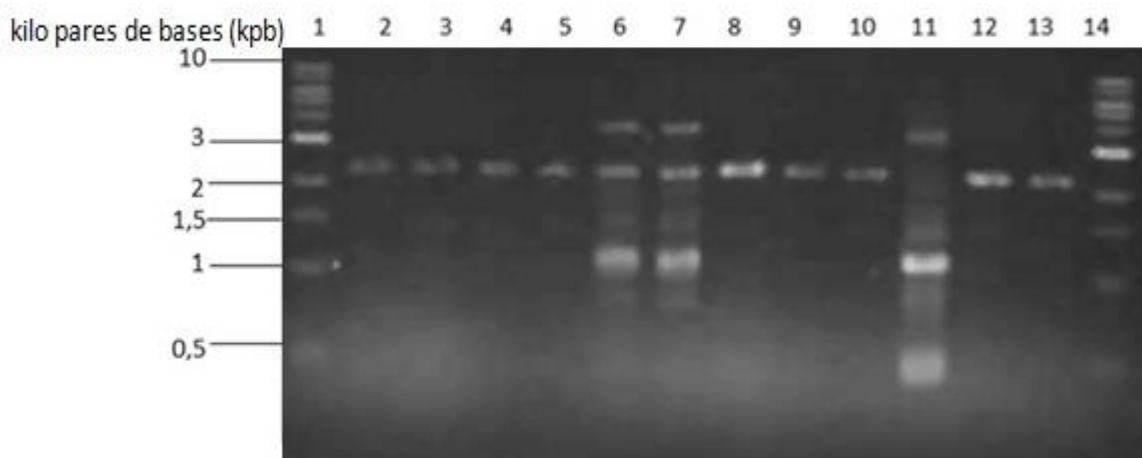


**Figura 7:** Dendrograma das caracterizações bioquímicas de 20 bactérias isoladas de raízes de plantas de milho e 4 estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*). O agrupamento das bactérias foi realizado por meio do programa NTSYS utilizando o coeficiente de Jaccard e o agrupamento por UPGMA.

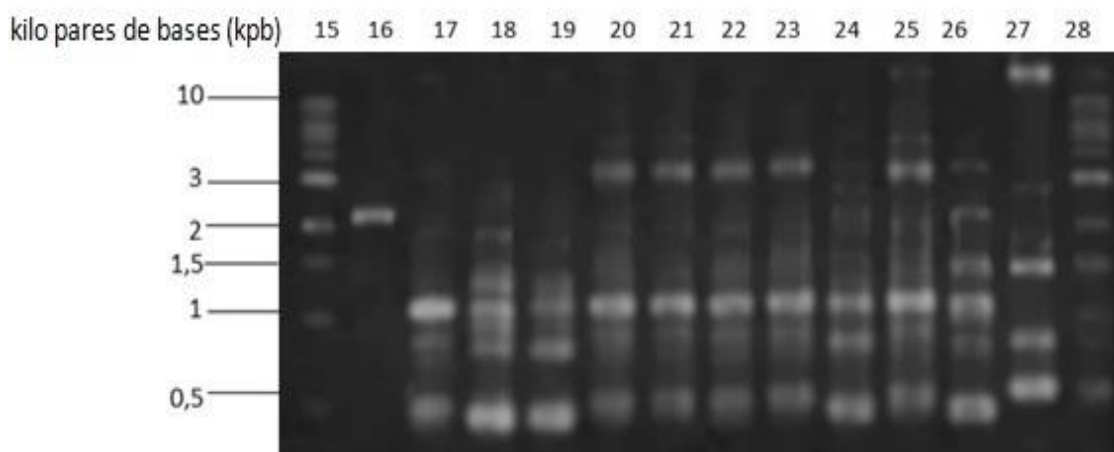
### 9. Caracterização Genética por Análise da Região BOX-PCR.

Pela a caracterização molecular dos fragmentos repetitivos do genoma referentes à região BOX com o primer BOX A1R foi possível a distinção dos isolados por amplificar diversos fragmentos de diferentes tamanhos e intensidades (Figuras 8 e 9). Pela análise do perfil de bandejamento dos

fragmentos amplificados foi possível observar no máximo 12 bandas e no mínimo 1 banda, com tamanhos variados e com 9 perfis diferentes entre as amostras. A formação de 9 perfis diferentes revela a diversidade existente entre os isolados estudados (Figuras 8 e 9).



**Figura 8:** Perfil eletroforético de 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região BOX (*primer* BOX A1R). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 - 1kb DNA Ladder.

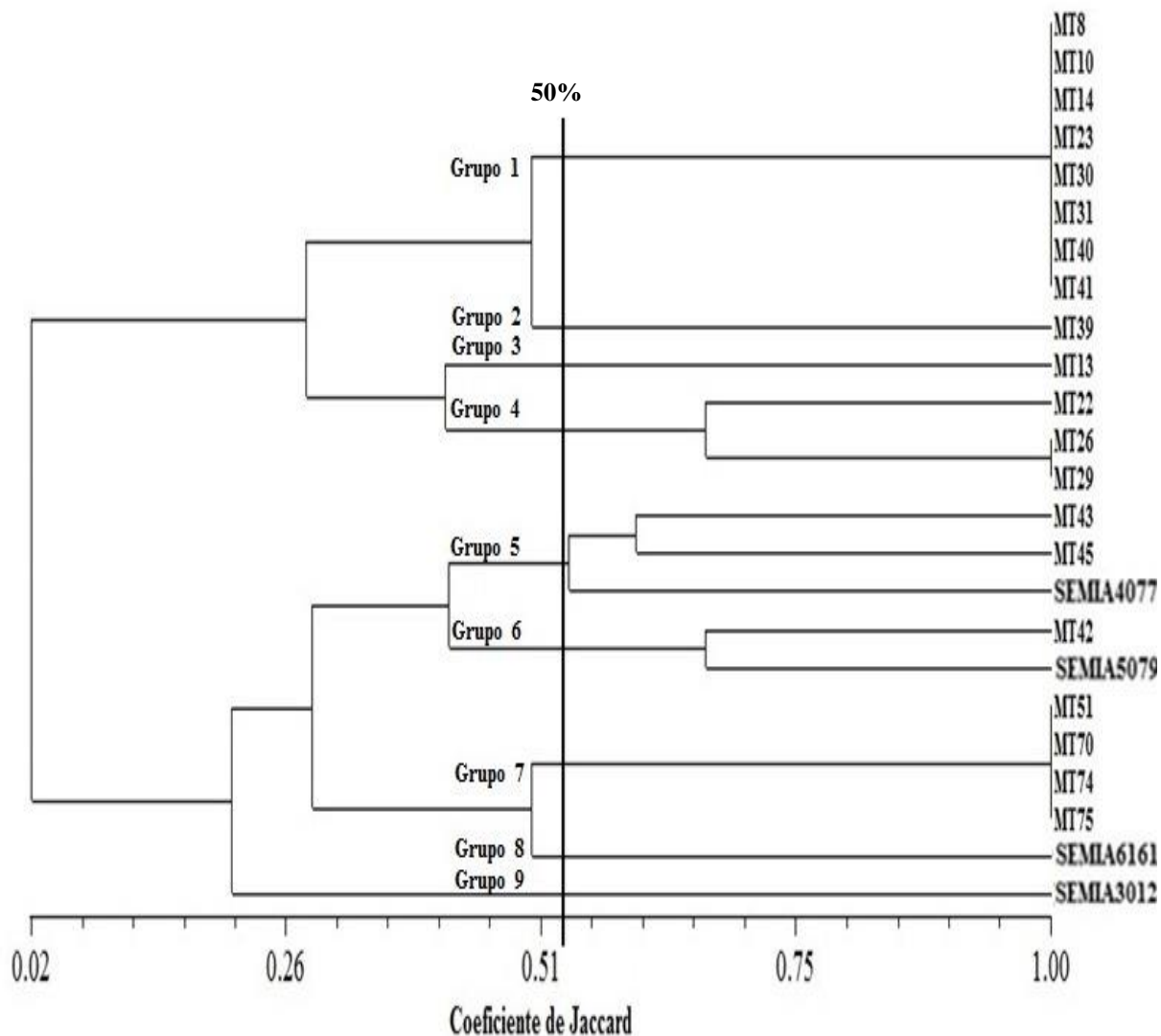


**Figura 9:** Perfil eletroforético de 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região BOX (*primer* BOX A1R). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Estirpe SEMIA 5079; Linha 25 - Estirpe SEMIA 6161; Linha 26 - Estirpe SEMIA 4077; Linha 27 - Estirpe SEMIA 3012; Linha 28 -1kb DNA Ladder.

A partir da análise dos dados obtidos da amplificação da região BOX foi gerado um dendrograma (Figura 10) que permitiu o agrupamento de similaridade com valor superior a 50% entre as bactérias estudadas. Foi observado a formação de um grupo maior (grupo 1) que foi composto pelos isolados MT8, MT10, MT14, MT23, MT30, MT31, MT40 e MT41, indicando que há similaridades entre estes em relação a essa região. Ainda foi observado que os fragmentos obtidos do material genético das bactérias estudadas apresentaram tamanhos que variaram entre 482 e 14.745 pares de bases (pb) (Figuras 8, 9 e 10).

Os isolados MT8, MT10, MT14, MT23, MT30, MT31, MT40 e MT41 compartilharam 1 banda com tamanho aproximado de 2,341 kpb. Já os isolados MT26 e MT29 compartilharam de 3 bandas que apresentaram valores de 3.937,

2.341 e 1.101 pb. E as bactérias MT51, MT70, MT74 e MT75 apresentaram 3 bandas com valores estimados de 3.504, 1.919 e 546 pb (Figuras 8, 9 e 10).



**Figura 10:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por BOX PCR de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).

O isolado MT22 também apresentou uma banda com valor aproximado de 2.341 pb e agrupou com MT26 e MT29 com similaridade em torno de 67%. Os isolados MT43 e MT45 apresentaram 3 bandas com valores aproximados de

1.236, 1.059 e 780 pb e formaram grupo com aproximadamente 58% de similaridade. Essas últimas ainda agruparam com a estirpe referência SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) com valor próximo de 53%, sendo observado nessa estirpe 5 fragmentos com valores aproximados de 3.242, 2.139, 1.415, 1.019 e 500 pb. Já a amostra MT42 agrupou com a estirpe SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) e compartilharam de 3 bandas com valores aproximados de 1.039, 808 e 509 pb, apresentando similaridade em torno de 67%, indicando a existência de significativas relações genéticas entre esses isolados e a estirpe de referência (Figuras 8, 9 e 10).

O *primer* BOX-A1R sintetizado corresponde à região conservada presente em muitos gêneros de bactérias e a análise por *primer* tem demonstrado resultados que geram perfis com maior número de bandas e menor custo na análise quando comparado a outros *primers* como REP e ERIC e tem sido utilizado para a caracterização de estirpes recomendadas para produção de bioinoculantes (HUNGRIA et al., 2008).

Madrzak e colaboradores (1995) relata que as seqüências BOX são altamente conservadas entre os rizóbios e foram utilizadas para discriminar e classificar diferentes estirpes em estudos de diversidade da população de *Bradyrhizobium* em solos na Polônia. Em estudos de populações de rizóbios vários trabalhos utilizaram a técnica de PCR-BOX e obtiveram resultados satisfatórios quanto à análise de diversidade e variabilidade genética desse grupo (LAGUERRE et. al., 1994; FERREIRA E HUNGRIA, 2002; HUNGRIA et. al., 2006; KASCHUK et al., 2006).

A observação do elevado número de bandas obtidos em perfis eletroforéticos era esperado para BOX-PCR, já que o uso desse oligonucleotídeo específico permite a detecção de um polimorfismo suficientemente elevado para análise genética de bactérias (CHUEIRE et. al., 2000).

Stroschein (2007) afirma que as estirpes de *Rhizobium* sp. apresentam um padrão de quatro bandas bem características com o tamanho aproximado de 4200, 1900, 1455 e 1264 pares de base quando se trata da região BOX. Nesse trabalho foram identificadas bactérias que apresentaram tamanhos de fragmentos com valores que variaram entre 482 e 14.745 pb, havendo entre eles valores próximos aos citados tanto em isolados quanto em estirpes de referência, conforme descrito anteriormente.

Pereira e colaboradores (2007) também observaram que a técnica de BOX-PCR permitiu a determinação de diversidade genética de grande número de rizóbios isolados de plantas de soja, com agrupamento de estirpes com baixo nível de similaridade.

Em seus estudos com rizóbios, Freitas e colaboradores (2007) usando a método de PCR-BOX também observaram a formação de 3 grupos maiores que tiveram similaridades de 100%, onde a maioria dos isolados agrupou com as estirpes referência do gênero *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium*, sendo observado ainda similaridades de 87% dos isolados com *Rhizobium tropici* e *Sinorhizobium terangue* e de 74% com *Mesorhizobium huakuii*. Nesse estudo também foram observadas elevadas similaridades entre os isolados e estirpes de referência.

Ainda, Antunes (2010) observou que os resultados da análise por BOX-PCR para os 50 isolados de rizóbios estudados, mostraram perfis de bandas bastante diversificados, com um complexo agrupamento entre os isolados e as estirpes de referência. Esses dados corroboram com os resultados obtidos para o BOX-PCR observados nesse estudo.

Vandamme e colaboradores (1996) relatam que o conhecimento polifásico deve ser aplicado à taxonomia e diversidade bacteriana já que um consenso de

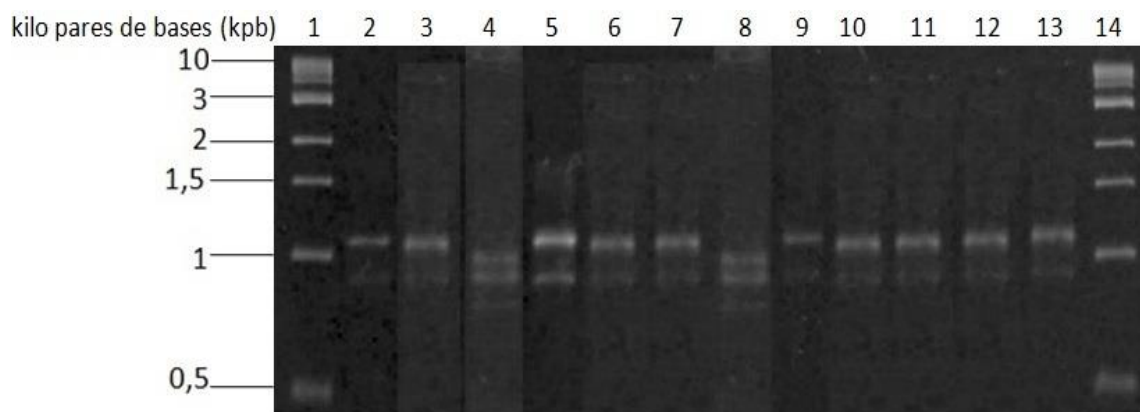
resultados combinados resultará em análises bem mais consistentes. Ao estudar 414 rizóbios de três leguminosas arbóreas tropicais, Bala e colaboradores (2003) identificaram 23 espécies e também destacaram a importância de uma análise polifásica.

Foi constatado por Freitas e colaboradores (2007) que o método BOX-PCR foi hábil para separar isolados fenotípica e genotipicamente próximos, mas afirma que a utilização de apenas uma técnica limita bastante sua capacidade de detectar uma vasta heterogeneidade genética dos rizóbios estudados.

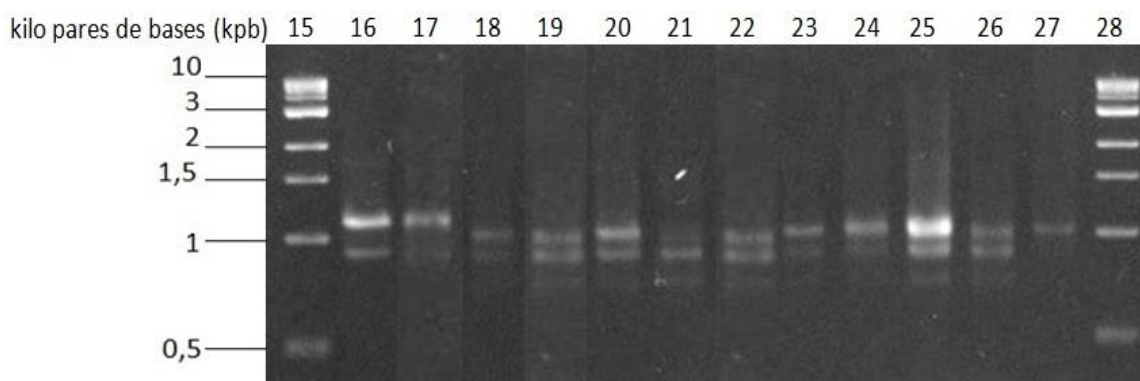
Nesse trabalho foi identificado diferentes perfis para os isolados o que gera a hipótese de que estes podem pertencer a gêneros ou espécies diferentes, porém isso poderá ser afirmado somente por meio de análises por sequenciamento do gene 16S rRNA.

#### *10. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região Intergênica 16S-23S rDNA.*

Foi realizada também a caracterização molecular dos fragmentos por PCR da região intergênica entre 16S e 23S rRNA. Observando o perfil de bandamento dos fragmentos foi possível identificar no máximo 4 bandas e no mínimo 1 banda com 4 perfis diferentes (Figura 11 e 12).



**Figura 11:** Perfil eletroforético de 12 isolados bacterianos amplificados por PCR da região intergênica 16S-23S rRNA (*primers* pHR e p23). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -1kb DNA Ladder.



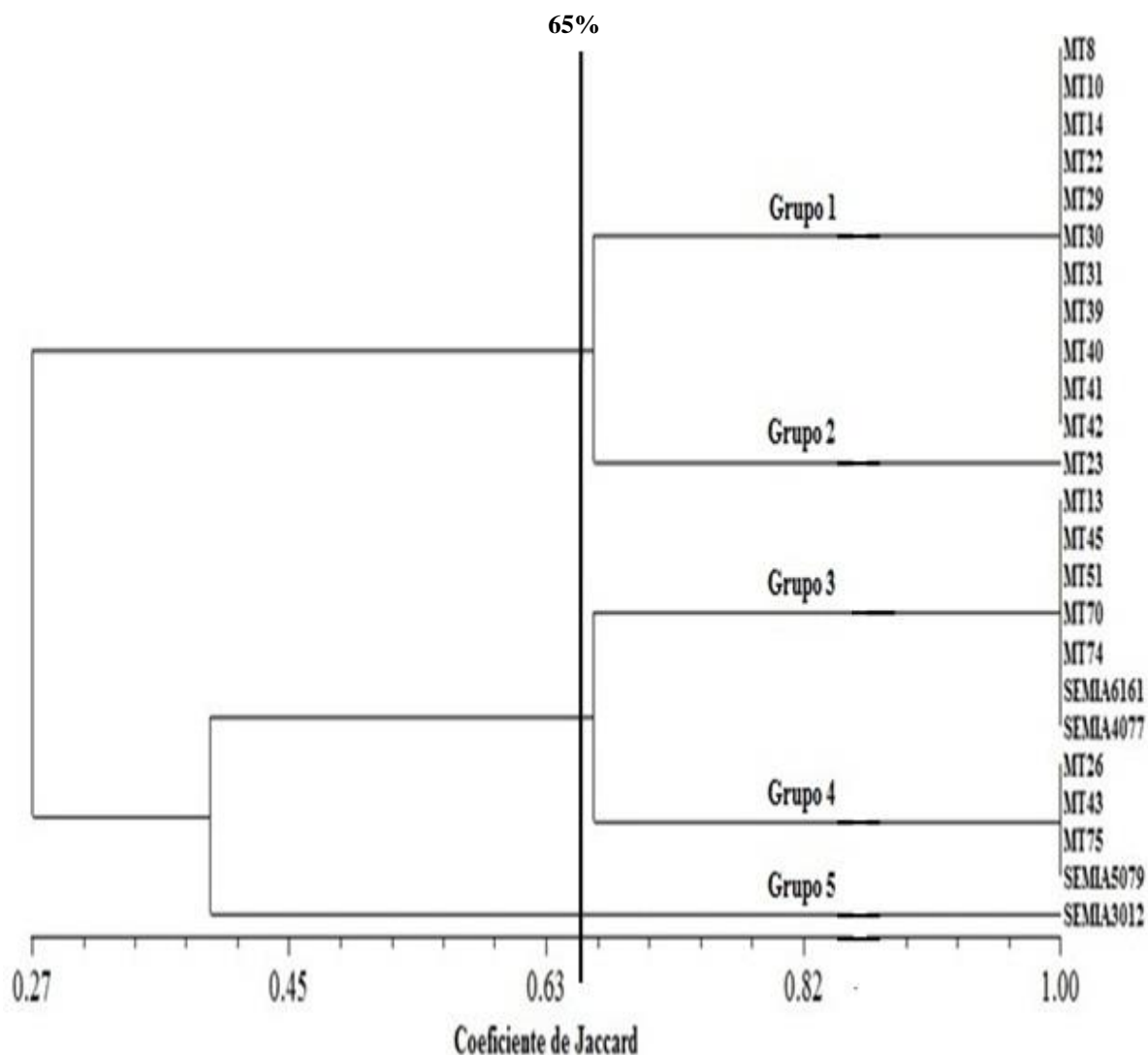
**Figura 12:** Perfil eletroforético de 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência amplificados por PCR da região intergênica 16S-23S rRNA (*primers* pHR e p23). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Estirpe SEMIA 5079; Linha 25 - Estirpe SEMIA 6161; Linha 26 - Estirpe SEMIA 4077; Linha 27 - Estirpe SEMIA 3012; Linha 28 -1kb DNA Ladder.



Os dados obtidos pelo perfil de bandeamento foram utilizados para as análises de similaridade resultando em um dendrograma que apresentou a formação de 5 grupos distintos. As 4 bandas amplificadas apresentaram valores aproximados de 725 pb, 853 pb, 1.058 pb e 1.100 pb (Figura 13).

Foi observado similaridades superiores a 80% entre as bactérias analisadas com a formação de um grupamento maior (grupo 1) comportando os isolados MT8, MT10, MT14, MT22, MT29, MT30, MT31, MT39, MT40, MT41 e MT42 que compartilharam uma banda com valor aproximado de 1.100 pb, indicando semelhanças entre as bactérias estudadas em relação a presença de regiões intergênicas (Figura 13).

Foi observado que o grupo 2 apresentou somente o isolado MT23 que apresentou 3 bandas distintas com valores aproximados de 715 pb, 1.002 pb e 1.115 pb. Já o grupo 3 apresentou os isolados MT13, MT45, MT51, MT70 e MT74 agrupandos com as estirpes de referência SEMIA 6161(*Sinorhizobium freedii*) e SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) que compartilharam 3 bandas de valores aproximados de 850 pb, 1.053 pb e 1.098 pb, apresentando regiões intergênicas de tamanhos semelhantes (Figura 13). O grupo 4 foi formado pelos isolados MT26, MT43 e MT75 que também agruparam com uma estirpe de referência, a SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), compartilhando 2 bandas com valores próximos de 849 pb e 1.050 pb. O grupo 5 por sua vez comportou apenas a estirpe de referência SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) que apresentou uma banda com valor aproximado de 852 pb (Figura 13).



**Figura 13:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região intergênica 16S-23S rRNA por PCR de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).

Em estudos de diversidade há relatos que dados de sequências da região espaçadora entre os genes 16S-23S rRNA têm sido agregada nos últimos anos, e o alinhamento de sequências disponíveis em bancos de dados mostra que pode ocorrer variação considerável intra e infra-específica, tanto no tamanho como na sequência de bases (LAGUERRE, et al., 1996; CHUEIRE, et al., 2003;

GERMANO, et al., 2006). Esse fato corrobora que esta região pode ser útil na diferenciação de estirpes de rizóbios recomendadas para produção de inoculantes.

Oliveira e colaboradores (2012) observaram em seus estudos que a amplificação da região espaçadora 16S-23S rRNA das estirpes de rizóbios gerou fragmentos com tamanhos que variaram entre 700 pb e 1.350pb. Já nesse trabalho com 24 bactérias, os fragmentos obtidos apresentaram variação de tamanho entre 725 e 1.100 pb.

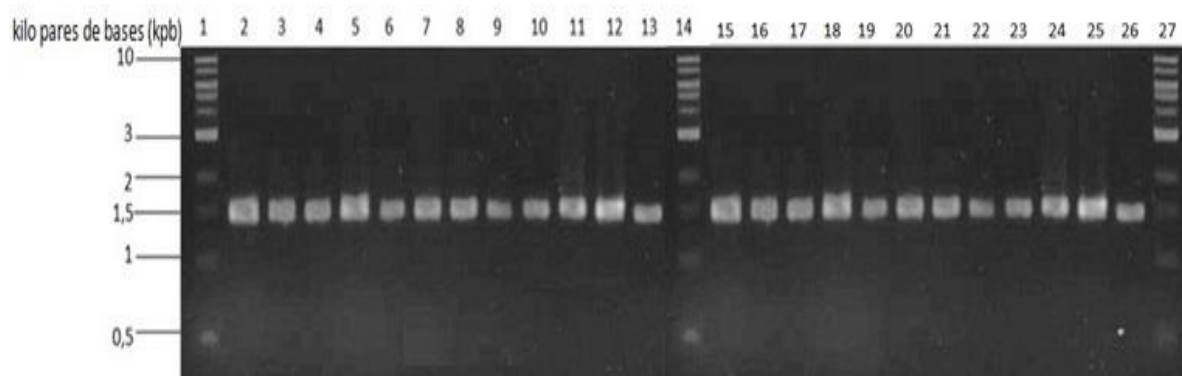
Ao estudar uma diversidade de lactobacilos, Song e colaboradores (2000) também identificaram variabilidade no tamanho e no número de cópias dos fragmentos amplificados por PCR da região intergênica 16S-23S do DNA dos isolados, fato também observado nesse trabalho. Afirmaram ainda que as modificações no genoma bacteriano, a recombinação e o processo de seleção natural também poderiam estar relacionados a grande diversidade observada.

A região intergênica compreende uma sequência que está sujeita a alterações, pois não codifica para genes específicos o que pode servir para diferenciar grupos que sofreram alterações genéticas por pressões ambientais. Ainda esta região pode indicar o número de operons dos genes ribossomais presentes nas bactérias. Assim, as bactérias que apresentaram somente 1 banda provavelmente tem apenas um tamanho de região espaçadora, já as que apresentaram 2 ou 3 bandas, indicam que há diferentes tamanhos para esta região.

### *11. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região 16S rRNA.*

A partir da amplificação do gene 16S rDNA foi possível observar que todos os isolados apresentaram uma banda de 1500 pares de bases (pb) (Figura

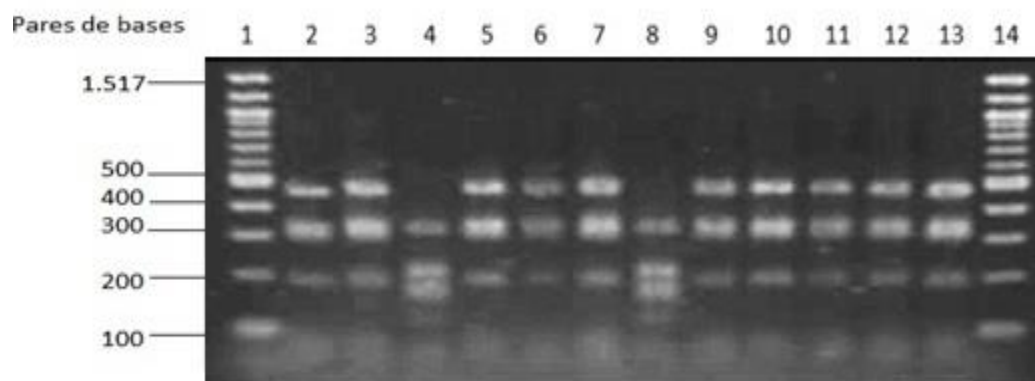
14). É conhecido que na maioria das bactérias o gene 16S rRNA tem tamanho aproximado de 1.500 pb. Toledo (2008) em seu estudo com rizóbios, explica que as reações de amplificação da região que codifica o gene 16S rDNA das estirpes estudadas resultaram em fragmentos de em torno de 1.500 pb.



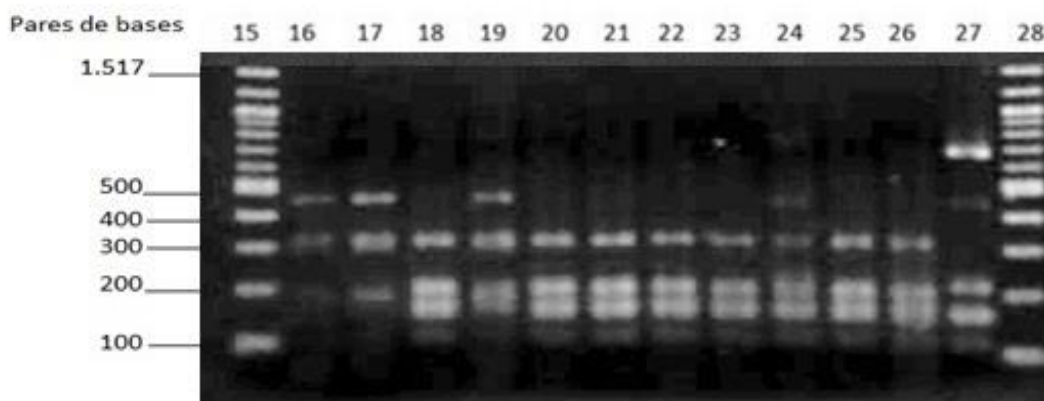
**Figura 14:** Perfil eletroforético das 24 bactérias dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA (*primers* Y1 e Y3). Gel de Agarose (0,7%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -1kb DNA Ladder; Linha 15 - Isolado MT41; Linha 16 - Isolado MT42; Linha 17 - Isolado MT43; Linha 18 - Isolado MT45; Linha 19 - Isolado MT51; Linha 20 - Isolado MT70; Linha 21 - Isolado MT74; Linha 22 - Isolado MT75; Linha 23 - Estirpe SEMIA 5079; Linha 24 - Estirpe SEMIA 6161; Linha 25- Estirpe SEMIA 4077; Linha 26 - Estirpe SEMIA 3012; Linha 27 -1kb DNA Ladder.

A amplificação do gene 16S rRNA não permite a distinção em diferentes perfis de bandejamento uma vez que amplifica um gene com tamanho de fragmento em torno de 1.500 pb, e por isso há necessidade de utilização de outras ferramentas para observar as variações nas sequencias de nucleotídeos deste gene.

Pela restrição com a enzima *Hae*III foi possível identificar no máximo 6 e no mínimo 3 bandas com diferentes tamanhos (Figuras 15 e 16). Os fragmentos obtidos variaram de tamanho entre 108 e 741pb. Os isolados MT8, MT10, MT14, MT22, MT23, MT29, MT30, MT31, MT39, MT40, MT41, MT42 e MT45 compartilharam de 3 bandas bem definidas que apresentaram valores aproximados de 472, 332 e 194 pb, enquanto as amostras MT13, MT26, MT43, MT51, MT70, MT74, MT75, SEMIA 5079, SEMIA 6161, e SEMIA 4077 apresentaram 4 bandas com valores aproximados de 332, 209, 162 e 124 pb (Figuras 15 e 16). Apenas a estirpe referência SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) que apresentou além desses 3 últimos fragmentos uma banda com valor mais elevado, em torno de 741 pb diferindo das demais bactérias (Figuras 15 e 16).



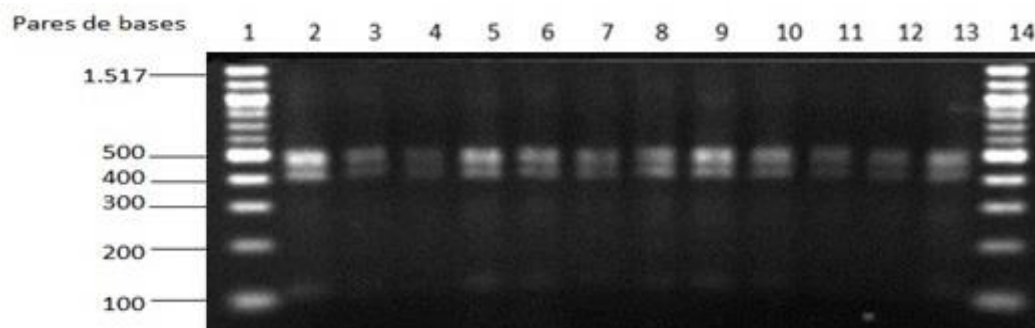
**Figura 15:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *Hae*III. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 - 100 pb DNA Ladder.



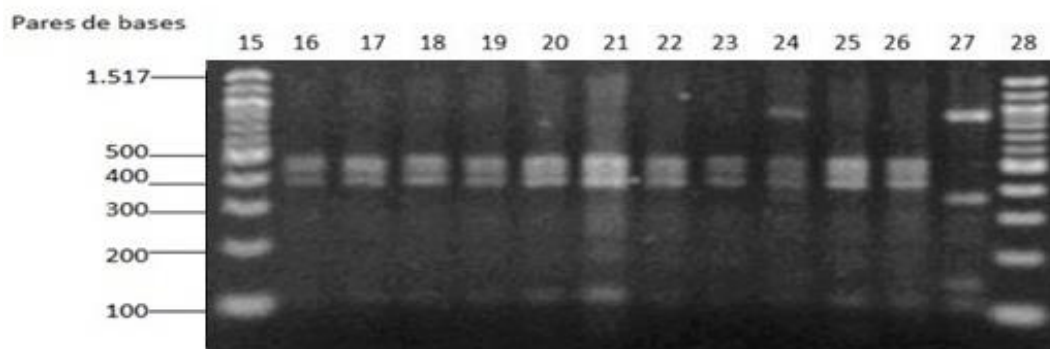
**Figura 16:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *Hae*III. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Isolado SEMIA 5079; Linha 25 - Isolado SEMIA 6161; Linha 26 - Isolado SEMIA 4077; Linha 27 - Isolado SEMIA 3012; Linha 28 -100 pb DNA Ladder.

Analisando o perfil eletroforético das 24 bactérias submetidos a restrição da enzima *Afa*I foi possível observar no mínimo 2 bandas e no máximo 6 (Figuras 17 e 18). Os isolados MT10, MT13, MT23, MT30, MT31, MT39, MT41, MT42, MT43, MT45, MT74 e MT75 apresentaram 2 bandas com valores aproximados de 500 e 421 pb enquanto os isolados MT8, MT14, MT22, MT26, MT29, MT40, MT51, MT70 e MT74 e as estirpes SEMIA 6161 e SEMIA 4077 apresentaram além dessas bandas, uma terceira com valor aproximado de 125 pb. A estirpe referência SEMIA 5079 também apresentou 2 bandas com os valores estimados em 500 e 421 pb e mais 1 banda com valor próximo de 890 pb (Figuras 17 e 18). Esta última banda também foi observada na estirpe referência SEMIA 3012 que ainda apresentou a banda com valor próximo de 125 pb presentes em algumas bactérias já mencionadas, e

individualmente apresentou uma banda com valor aproximado de 138 pb (Figuras 17 e 18).

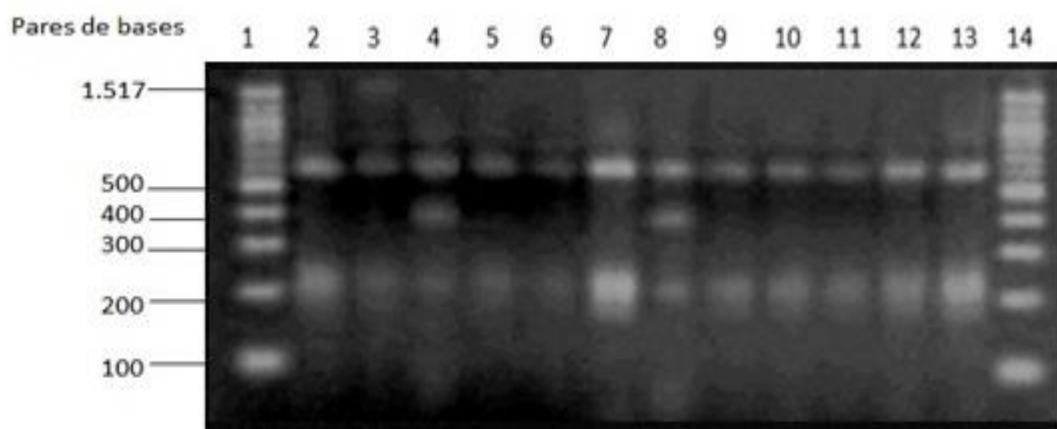


**Figura 17:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AfaI*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -100 pb DNA Ladder.



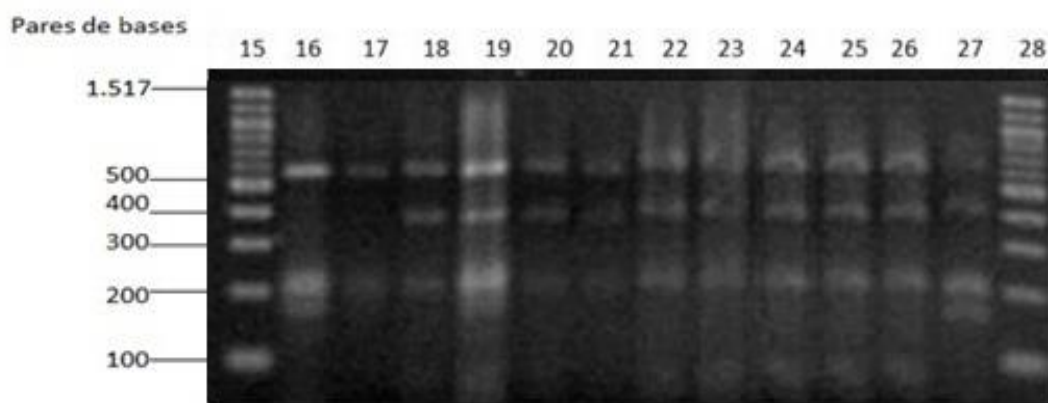
**Figura 18:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 8 isolados bacterianos e 4 estipes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AfaI*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Isolado SEMIA 5079; Linha 25 - Isolado SEMIA 6161; Linha 26 - Isolado SEMIA 4077; Linha 27 - Isolado SEMIA 3012; Linha 28 -100 pb DNA Ladder.

No tratamento do gene 16S com a enzima *AluI* foi observado no mínimo 2 bandas e no máximo 5 (Figuras 19 e 20). Os isolados MT8, MT10, MT14, MT22, MT29, MT30, MT31, MT39 e MT42 apresentaram 2 bandas com valores aproximados de 613 e 216 pb, já os isolados MT14, MT26, MT43, MT45, MT51, MT70, MT74 e MT75 apresentaram além dessas bandas, uma terceira com valor próximo de 421 pb. As amostras MT23, MT40, MT41, MT45 e a estirpe referência SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) apresentaram além das bandas com 613 e 216 pb, uma terceira com valor próximo de 173 pb (Figuras 19 e 20). Já as estirpes referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA6161 (*Sinorhizobium freedii*) e SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) apresentaram além das bandas com 613, 421 e 216pb, uma quarta banda com valor inferior a 100 pb (Figuras 19 e 20).



**Figura 19:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 12 isolados bacterianos dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AluI*. Gel de Agarose (2,5%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado MT8; Linha 3 - Isolado MT10; Linha 4 - Isolado MT13; Linha 5 - Isolado MT14; Linha 6 - Isolado MT22; Linha 7 - Isolado MT23; Linha 8 - Isolado MT26; Linha 9 - Isolado MT29; Linha 10 - Isolado MT30; Linha 11 - Isolado MT31; Linha 12 - Isolado MT39; Linha 13 - Isolado MT40; Linha 14 -100 pb DNA Ladder.



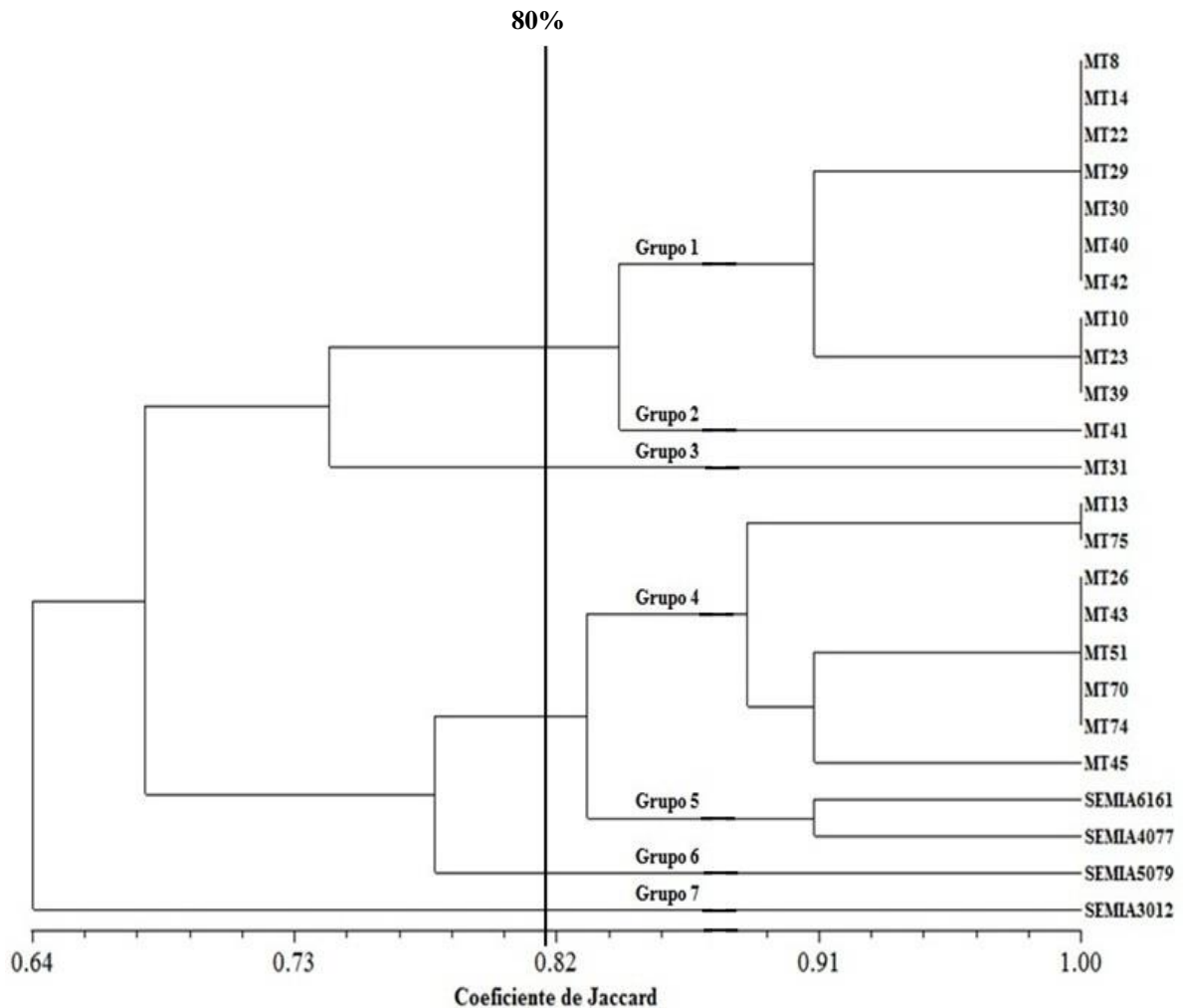


**Figura 20:** Perfil eletroforético de ARDRA dos 8 isolados bacterianos e 4 estirpes de referência dos fragmentos amplificados por PCR da região 16S rDNA e submetidos a digestão da enzima *AluI*. Gel de Agarose (0,8%). Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 15- 1kb DNA Ladder; Linha 16 - Isolado MT41; Linha 17 - Isolado MT42; Linha 18 - Isolado MT43; Linha 19 - Isolado MT45; Linha 20 - Isolado MT51; Linha 21 - Isolado MT70; Linha 22 - Isolado MT74; Linha 23 - Isolado MT75; Linha 24 - Isolado SEMIA 5079; Linha 25 - Isolado SEMIA 6161; Linha 26 - Isolado SEMIA 4077; Linha 27 - Isolado SEMIA 3012; Linha 28 -100 pb DNA Ladder.

A partir de todos os perfis eletroforéticos obtidos pela restrição dessas 3 enzimas, foi produzido um dendrograma que relacionou os 20 isolados e as 4 estirpes referência formando 7 grupos distintos com similaridade superior a 80% (Figura 21).

Foi possível observar que os isolados MT8, MT14, MT22, MT29, MT30, MT40 e MT42 apresentaram alta similaridade com os isolados MT10, MT23 e MT29. Estes dois grupos apresentaram similaridade aproximada de 84% com o isolado MT41 e de 73% com o isolado MT31 (Figura 21). Os isolados MT13 e MT75 apresentaram similaridade em torno de 87% com o com os isolados MT26, MT43, MT51, MT70 e MT74 que também apresentaram similaridade próxima de 90% com o isolado MT45. Ainda os isolados MT13, MT75, MT26, MT43, MT51, MT70, MT74 e MT45 apresentaram similaridade em torno de 83% com as estirpes referência SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*) e SEMIA

4077 (*Rhizobium tropici*) e de aproximadamente 75% com a estirpe referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) (Figura 21). Já a estirpe referência SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) agrupou com todas as bactérias com similaridade aproximada de 64% (Figura 21).



**Figura 21:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos obtidos de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*) que foram amplificadas da região 16S rRNA por PCR submetidos a digestão de 3 enzimas (*HaeIII*, *AfaI* e *AluI*).

A análise da região do gene 16S rRNA por ARDRA, como recurso de comparação entre os microrganismos, promoveu grande avanço na obtenção de

dados de diversidade microbiana, contribuindo com as informações já obtidas através das técnicas de cultivo e análises morfológicas, elucidando a presença de novos microrganismos ainda desconhecidos (MACRAE, 2000).

O método de ARDRA se baseia nos dados de sítios de restrição dos genes que codificam para o gene ribossomal 16S na família *Rhizobiaceae* e utiliza enzimas de restrição para fragmentar o DNA em diferentes comprimentos, evidenciando o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos. Ainda com a combinação de diferentes metodologias de marcação e detecção, a técnica auxilia significativamente nos processos de caracterização da diversidade entre diferentes populações de rizóbios (LAGUERRE et al., 1994).

Em seu estudo com rizóbios, Antunes (2010) observou que os perfis de restrição obtidos com as endonucleases *DdeI*, *HhaI* e *MspI* apresentaram variabilidade suficiente para discriminação dos isolados e que os isolados apresentaram similaridades entre 65 e 100% em todos os dendrogramas com a formação de 3 agrupamentos que apresentaram isolados e estirpes de referência pertencentes ao grupo de rizóbios.

Utilizando 3 enzimas de restrição diferentes, Oliveira e colaboradores (2012) observaram que cada enzima utilizada gerou de dois a seis fragmentos em estirpes de rizóbios onde a maioria destas apresentou polimorfismos nessa região havendo alta similaridade entre os isolados. Ainda afirmaram que perfis de ARDRA semelhantes entre estirpes de rizóbios estreitamente relacionadas tem sido documentado com o uso de até duas enzimas de restrição, devido à presença de domínios altamente conservados nas sequências dos genes que codificam as regiões 16S rRNA, mas que para contribuir para determinação taxonômica dos isolados é necessário o uso mais enzimas de restrição (OLIVEIRA et al., 2012).

## CONCLUSÕES

- Quanto a diversidade morfológica, 4 isolados apresentaram similaridade superior a 70% com estirpes de rizóbios de referência, havendo a formação a formação de 6 grupos diferentes.
- Foi observada ampla diversidade metabólica nos isolados estudados a partir dos testes realizados (bioquímicos e enzimáticos), sendo características relacionadas à adaptação das bactérias e também a promoção de crescimento vegetal. Um total de 8 isolados apresentaram similaridade superior a 70% com estirpes de rizóbios de referência em relação a caracterização bioquímica, havendo a formação de 7 grupos diferentes.
- A caracterização das bactérias pela técnica de PCR-BOX mostrou significativa variabilidade entre os isolados para essa região, indicada pela análise de similaridade superior a 50% de 3 isolados com estirpes de rizóbios de referência, havendo a formação de 9 grupos distintos.
- A amplificação da região intergênica 16S-23S rRNA mostrou diferenças entre as bactérias, revelando possíveis variações populacionais. Um total de 8 isolados apresentaram superior a 80% com estirpes de rizóbios de referência, havendo a formação de 5 grupos diferentes.
- A amplificação da região 16S rRNA associada a técnica ARDRA revelou polimorfismo entre as bactérias, permitindo a formação de 7 grupos onde 8 isolados apresentaram similaridades superior a 80% com estirpes de rizóbios de referência.

- A aplicação de diferentes técnicas permitiu verificar a diversidade genética entre as bactérias isoladas de plantas de milho cultivadas no Cerrado.
- Pelos resultados obtidos das análises genéticas utilizadas, foi possível observar uma diversidade de perfis genéticos mesmo considerando uma pequena amostragem (20 isolados) de bactérias obtidas de raízes de plantas de milho cultivadas no Cerrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho.** 2007. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2007.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; ACHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.

ANDRONOV, E. E.; TEREFEWORK, Z.; ROUMIANTSEVA, M. L.; DZYUBENKO, N. I.; ONICHTCHOUK, O. P.; KURCHAK, O. N.; DRESLER-NURMI, A.; YOUNG, P. W.; SIMAROV, B. V.; LINDSTRÖM, K. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center in the Caucasus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1067-1074, 2003.

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

ANTUNES, J. E. L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.).** 2010. 108f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, 2010.

ARTURO, A.; ODELSOR, D. A.; HICHEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprint of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A. D. L.; Elsas, J. D. V.; Bruijn, F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p.1- 8, 1995.

AUDY, P.; BRAAT, C. A.; SAIDON, G.; HUANG, H. C.; LATOCHE, A. A rapid and sensitive PCR-Based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blight in bean seed. **Phytopatology**, St. Paul, v.86, p.361- 366, 1996.

AUSEBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. Short Protocols in Molecular Biology. **John Wiley & Sons**, New York, v.3, n.4, p.1-11, 1999.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, v.12, p.917-930, 2003.

BANO, N.; MUSSARAT, J. Isolation and characterization of phorate degrading bacteria of agricultural significance. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p.324-328, 2003.

BARETTA, C. R. D. M. **Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia***. 2007. 184f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2007.

BARRAQUIO, W. L.; REVILLA L.; LADHA, J. K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, p.15-24, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n.8, p.521-577, 2004.

BELIMOV, A. A.; KOJEMIAKOV, A. P.; CHUVARLIYEVA, C. V. Interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v.173, p.29-37, 1995.

BERGE, O.; LODHI, A.; BRANDELET, G.; SANTAELLA, C.; RONCATO, M. A.; CHRISTEN, R.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. *Rhizobium alarii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.367-372, 2009.

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

BEYNOM, R. J., BOND, J.S. Proteolytic enzymes: A practical approach. Academic press. Oxford, 1989.

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

BOBATO, A. **Índice nutricional do nitrogênio: uma ferramenta para o diagnóstico do estado nutricional da cultura do milho**. 2006. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2006.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.69, n.9, p.155-194, 2005.

BUCHANAN, R. E. Approved lists of bacterial names. In: SKERMAN, V. B. D.; McGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. (Ed.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.30, p.225-240, 1980.

BUCHENAUER, H. Biological control of soilborne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.105, n.4, p. 329-348, 1998.

CASTRO, P. R. C; Kluge, R. A: Ecofisiologia de cultivos anuais: Trigo, milho, soja, arroz e mandioca. São Paulo, Nobel, 1999 IN: Milho: VIEIRA JR, P. A.; COELHO, A. M.; De FRANÇA, G. E; **Nutrição e adubação do milho**, EMBRAPA MILHO E SORGO, 2010.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.8, p.2767-2772, 1996.

CHAVANNE, X; FRANGI, J. P. Le rendement énergétique de laproductiond'éthanolà partir de maïs, C. R. **Geoscience**, v.360, n.5, p.519-325, 2008.

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

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; De VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1729-1735, 2001.

CHI, F.; SHEN, S. H.; CHENG, H. P.; JING, Y. X.; YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.11, p.7271-7278, 2005.

CHOUDDHURY, A. T. M. A.; KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production, **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v.39, p.219-227, 2004.

CHRISTENSEN, W. B. **Urea Agar Base**. Disponível em: <http://www.microtradeuk.com/images/U.pdf?osCsid=e502e88fb6ddc77f7d9ab484a4584c2f>. Acesso em: Mai/2013.



CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.27, n.5, p.833-840, 2003.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro.** (Embrapa Soja. Boletim de Pesquisa, n.3). Londrina: Embrapa Soja, 32p, 2000.

COGO, L. L. **Caracterização molecular de genes de virulência de isolados clínicos de *Helicobacter pylori* determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes fitoterápicos utilizados na medicina popular brasileira.** 2008. 107f. Dissertação (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2008.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p.491- 503, 1999.

CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho.** 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção). Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_3ed/autores.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/autores.htm). Acesso em: Maio/2013.

DA RÓZ, A. L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. **Polímeros**, Rio de Janeiro, v.13, p.4-6, 2003.

DAKORA, F. D.; PHILLIPS, D. A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments. **Plant and Soil**, v.245, p.35-47, 2002.

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

DEMBA, D. M.; WILLEMS, A.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; VANDEKERCKHOVE, T. T.; LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; VYVERMAN, W.; GILLIS, M.; GUCHT, K. V. D. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N<sub>2</sub> fixing bacterial diversity in soil under *Acácia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dry land part of Senegal. **Environmental Microbiology**, New York, v.6, p.400-415, 2004.

DOBEREINER, J., FRANCO, A. A.; GUSMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.5, p.155-161, 1970.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110), Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 38p, 1999.

DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants**. New York: Springer-Verlag, 155p, 1987.

DUARTE, J. O. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 3. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_3ed/economia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_3ed/economia.htm). Acesso em: Maio/2013.

DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. **Produção de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção, 2ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 5ª edição Set./2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Embrapa Milho e sorgo**, 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br>. Acesso em: Set/2011.

FERNANDES JR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p.1184-1190, 2009.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVALA, P. T.; ODA, S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Monitoramento e Colonização da Bactéria Endofítica e Geneticamente Modificada *Pantoea agglomerans* em Mudas de *Eucalyptus*. **Holos Environment**, Suplemento 1 - III Workshop de Ecotoxicologia. Resumo, v.8, n.2, 2008.

FERREIRA, M. C.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; TAKEMURA, S. M.; HUNGRIA, M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.32, p.627- 637, 2000.

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncroppedsoils in Brazil. **Field Crops Research**, v.79, p.139-152, 2002.

FIGUEIREDO, M. V.; SELDIN, L.; ARAÚJO, F. F.; MARIANO, R. L. R. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications**, 2010. Disponível em: [www.springer.com/9783642136115-c1.pdf](http://www.springer.com/9783642136115-c1.pdf). Acesso em: Maio/2013.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Departement de l'agriculture: Maïs dans la nutrition humaine. Collection geografia FAO. **Alimentation e nutrition**, n.25, 2006.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **El maizena la nutrición humana**. Roma, 110p, 1993. (Estúdio de Alimentación y Nutrición, 35/1).

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

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madsison: The University of Wisconsin Press, 343p, 1932.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; ROSÁLIA, C. E. S. S. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia: revista de ciências agronômicas**, Campinas, p.497-504, 2007.

FREITAS, J. R.; GERMIDA, J. J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.24, n.11, p.1127-1135, 1992.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.44, n.1, p.6-29, 1996.

GAO, J. L.; TURNER, S. L.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; TAN, Z. Y.; QIU, Y. H.; GU, J.; TEREFEWOR, Z.; YOUNG, J. P. W.; LINDSTROM, K.; CHEN, W. X. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2003-2012, 2004.

GARCIA, C. E. **Isolamento e Identificação de actinobactérias em Solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA sequenciamento do gene 16S rRNA**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2006.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9ed., v.1, The Archaea and the peeply branching and phototrophic bactéria 2<sup>nd</sup>, New York: Tehe Williams & Wilkins, Springer - Verlag, p.119-154, 2001.

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of *Bradyrhizobial* strains

from thirty three legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.217-229, 2006.

GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast and slow growing species of *Rhizobium*. **Archives of Microbiology**, v.129, n.3, p.233-239, 1981.

GRANGE, L. E.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004.

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

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v.37, n.2, p.25-30, 2003.

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

HAHM, B. K.; MALDONADO, Y.; SCHREIBER, E.; BHUNI, A. K.; NAKATSU, C. H. Subtyping of food borne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v.53, p.387-399, 2003.

HALL, T. **BioEdit – Biological sequence alignment editor for Windows95/98/NT/2K/XP**. (2005). Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Acesso em: Jun/13.

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K. A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p.179-185, 2004.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, n.3, p.597-607, 1975.

HARRISON, S. P.; MYTTON, L. R.; SKØT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.1009-1015, 1992.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. E. Fixação biológica do nitrogênio com a cultura de soja. **Workshop Nitrogênio na sustentabilidade**

**de sistemas intensivos de produção agropecuária**, p. 51-75, Dourados-MS, 2000.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MEGIAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant Soil**, v.288, p.343–356, 2006.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR**. Londrina, 2008. 12p. (Embrapa Soja: Comunicado Técnico, 79).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microorganismos de importância agrícola**, Brasília, Embrapa-SPI, p.1-236, 1994.

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, v.21, p.561-568, 2001.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays L.*)**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias (GCEA/IBGE, DPE, COAGRO). **Levantamento sistemático da Produção Agrícola outubro de 2005**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: Maio/2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola**, 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia>. Acesso em Maio/2011.

INUI, R. N. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar**. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

JENSEN, H.; SCHROEDER, M. Urea and biuret as nitrogen source for *Rhizobium* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, v.28, n.1, p.473-478, 1965.

JORDAN, D. C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore-London: Williams & Wilkins Co., v.1, p.235-244, 1984.

JOURAND, P.; GIRAUD, F.; BENA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; De LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2269-73, 2004.

JÚNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização genética de rizóbio isolados de solos no Amazonas baseada na técnica de PCR-RFLP. **Comunicações científicas. Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.4, p.841-846, 2009.

KALITA, M.; MALEK, W. Phenotypic and genomic characteristics of rhizobia isolated from *Genista tinctoria* root nodules. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.707-715, 2004.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, n.2, p.210-220, 2006.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, 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**, v.6, p.1244-1251, 2004.

LANDI, L.; VALORI, F.; ASCHER, J.; RENELLA, G.; FALCHINI, L.; NANNIPIERI, P.. Root exudate effects on the bacterial communities, CO<sub>2</sub> evolution, nitrogen transformations and ATP content of rhizosphere and bulk soils. **Soil Biological**, v.38, p.509-516, 2006.

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

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions:

Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2029-2036, 1996.

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

LEITE, J. **Caracterização de Bactérias Nativas de Solos do Semiárido Brasileiro Isoladas de Nódulos de Feijão-caupi**. 2011. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Rio de Janeiro, 2011.

LIU, J.; WANT, E. T.; CHEN, W. X. Diverse Rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cersis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of the China. **Systematic and applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n.5, p.465-477, 2005.

LLOYD, A. B.; SHEAFFE, M. J. Urease activity in soils. **Plant Soil**, v.39, n.1, p.71-80, 1973.

LOPES, A. A. C.; JUNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.; ALVES, G. C.; MARRIEL, I. E.; REIS, V. M. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. In: IX Simpósio Nacional sobre o Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, 2008, Brasília. **Anais do evento - CD**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

MACHADO, A. T. Perspectiva do melhoramento genético em milho (*Zea mays* L.) visando eficiência na utilização do nitrogênio. 1997. 219f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 1997.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.77-82, 2000.

MADIGAN, J. M.; MARTINKO, P. V.; DUNLAP, D. P.; CLARK, M. T. **Microbiologia de Brock**. 12ed, Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.

MADRZAK, C. J.; GOLINSKA, B.; KROLICZAK, J.; PUDELKO, K.; LAZEWSKA, D.; LAMPKA, D.; SADOWSKY, M. J. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1194-1200, 1995.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, n.8, p.121-137, 2000.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. **I. Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 24p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 91).

MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.31, n.1, p.106-115, 2008.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; De VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.489-503, 2007.

MARTINEZ-MOLINA, E.; MORALES, V. M.; HUBBELL, D. H. Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, n.6, p.1186-1188, 1979.

MARTINEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.

Mc. INROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. **Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria in maize and cotton in the field.** In: Bulletin SROP XIV, 8, 1991, New York: Wallingford and New York, 1991, p. 328-331.

MÉNDEZ, J. **Evaluación en Guatemala de 9 cepas de *Rhizobium phase oli* seleccionadas para pruebas internacionales de fijación de nitrógeno em frijol, probadas em la variedad ICTA81.** 2004. 40f. (Tesis de graduación, Facultad de Agronomía) - Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 2004.

MIKSCH, G.; EBERHARDT, U. Regulation of urease activity in *Rhizobium meliloti*. **FEMS Microbiology Letters**, v.120, n.1-2, p.149-154, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de Gram.** Brasília, p.1-67, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** Lavras: UFLA, p.449-542, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Quality-protein maize.** Washington: National Academy, 100p, 1988.



NAUTIYAL, C. S. An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.70, p.265-270, 1999.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, n.29, p.62-76, 2002.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGELI, E. V.; HUNGRIA, M.; SILVEIRA, J. R. P.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B. Caracterização da região espaçadora 16-23S rDNA para diferenciação de estirpes de rizóbios utilizadas na produção de inoculantes comerciais no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p.1423-1429, 2012.

OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; ALOUFA, M. A. I.; CASTRO, E. M.; SANTANA, J. R. F.; NOGUEIRA, R. C. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1447-1451, 2008.

PACHECO, F. **Sequenciamento, identificação e análise de genes de arroz envolvidos na interação com *Herbaspirillum seropedicae***. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2008.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos. In: CRUZ, J. C.; KARAN, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p.47-61, 2008.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de Milho. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Circular Técnica 75, Sete Lagoas – MG, 2006.

PAN, B.; BAI, Y. M.; LEIBOVITCH, S.; SMITH, D. L. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v.11, n. 3-4, p.179-186, 1999.

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

PEIXOTO, C. M. **O milho: o rei dos cereais – da sua descoberta há 8000 anos até as plantas transgênicas**, 2002. Disponível em: <http://seednews.inf.br/português/seed62/milho.shtml>. Acesso em Maio/2013.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. O.; CAMPO, R. J.; TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1397-1412, 2007.

PEREIRA, M. D., BRASIL, M. S. **Caracterização morfofisiológica de rizóbio nativo de leguminosa forrageira do pantanal sul mato-grossense**, 2008. Disponível em: <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=621>. Acesso em Março/2013.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; Baldani, J. I.; ESTRADA de LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1931-1937, 2006.

PIAZA, G. **Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2006.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorous in soil inconnection with vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, v.17, p.362-370, 1948.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHELS, K.; VANDERLEYDEN, J. and H. RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.665-693, 1999.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

RAVEN, P. H.; RAY, F. E.; SUSAN, E. E. **Biologia Vegetal**. 2ed, São Paulo: Guanabara Koogan, 1992.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Marburg, v.6, n.4, p.139-144, 1998.

REIS JR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp.. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.431-438, 2006.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTÍNEZMOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, na aquatic legume from India. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.47-53, 2003.

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

ROESCH, L. F. W. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul**. 2007. 143f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2007.

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

ROHLF, F. J. NTSYS-Pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. **Exeter Publishing**, New York, 1988.

ROMEIRO, R. S. **Organismos procariotas e promoção de crescimento em plantas**. Disponível em: <http://www.seres.iciag.ufu.br/Siciac-Romeiro%5B1%5D.pdf>. Acesso em: Mai/2013.

ROSS, J. J.; O'NEILL, D. P.; SMITH, J. J.; KERCKHOFFS, L. H. J; ELLIOTT, R. C. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. **Plant Journal**, v.21, p.547-552, 2000.

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2003. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Serapédica, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, v.2, n.1, p.843-859, 1989.

SANGER, F., NICKEN, S., COLSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SARAVANAN, V. S.; OSBORNE, J.; MADHAIYAN, M.; MATHEW, L.; CHUNG, J.; AHN, K.; SA, T. M. Zinc metal solubilization by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and induction of pleomorphic cells. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v.17, p.1477-1482, 2007.

SCHNEIDER, M.; De BRUIJN, F. J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic patterns analysis. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.12, p.163-174, 1996.

SELENSKA-POBELL, S. Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. In: ACKERMANS, A. D. L.; Van ELSAS, J. D., De BRUIJN, F. D. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic, Dordrech, p.1-17, 1995.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de Fostatos por Microrganismos na Presença de Fontes de Carbono. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.24, p.11-319, 2000.

SILVA, M. F. **Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de bactérias do gênero *Azospirillum* de raízes de plantas de milho (*Zea mays*)**. 2000. 96f. Trabalho de Graduação (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual de Goiás, UEG, Anápolis, 2010.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de Bactérias Promotoras de Crescimento no Cultivo de Arroz em Solução Nutritiva**. 2008. 99f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, São Paulo, 2008.

SNEATH, P. H. A. International Code of Nomenclature of Bacteria (1900 Revision), **American Society for Microbiology**, Washington, DC, 1992.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. **Methods in legume-Rhizobium Technology**. Hawaii, United States of America: University of Hawaii NifTAL projecta and MIRCEN, 369 p, 1985.

SONG, L.; KATO, N.; LIU, C.; MATSUMIYA, Y.; KATO, H.; WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group-and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.187, n.43, p.167-173, 2000.

SOUZA, R. N.; SILVA, M. F. **Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de bactérias do gênero *Herbaspirillum* de raízes de plantas de milho (*Zea mays*)**. 2010. 14p. Anais do VIII Seminário de Iniciação Científica e V Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação. Universidade Estadual de Goiás, UEG, Anápolis, 2010.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**, USA, v.54, n.1, p.257-288, 2000.

SRIDHAR, S. B.; SHEETAL, U. D.; PAI, M. R. S. M.; SHASTRI, M. S. Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocin-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.3, p.463-468, 2005.

SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D. J.; HOLL, F. B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, n.10, p.1006-1014, 1996.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.382-385, 1998.

STROSCHEIN, M. R. D. **Caracterização de Bactéria Fixadora de Nitrogênio em *Lupinus albus***. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, 2007.

TEIXEIRA, J. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, M. A. **Isolamento de Bactérias Diazotróficas do Solo e de Raízes de *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum* e *Zea mays* Cultivados em Solos do Cerrado**. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/4130/3077>. Acesso em: Maio/2013.

TEREFEWOR, Z.; KAIJALAINEN, S.; LINDSTROM, K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.169-180, 2001.

TISSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rDNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, n.1, p.49-56, 1997.

TOFFANIN, A.; CADAHIA, E.; RUIZ-ARGÜESO, J. I. T.; Palacios, J. M. Characterization of the urease gene cluster from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **Archives of Microbiology**, v.177, n.4, p.290-298, 2002.

TOLEDO, B. F. B. **Identificação de Estirpes de Rizóbios por Sequenciamento Parcial dos Genes 16S rDNA e nifH**. 2008. 139f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2008.

TRUPER, H. G.; SCHLEIFER, K. H. Prokaryote characterization and identification. In: BALOWS, A., TRUPER, H. G., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K. H. (Ed.). **The Prokaryotes**, Springer, New York, 2 Ed, v.1, p.123-148, 1991.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Isolamento de microrganismos**. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufba.br/aulas/Provas%20bioquimicas.doc>. Acesso em: mai/2013.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v.60, p.407-438, 1996.

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**, v.91, p.127-141, 2001.

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

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

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

VIEIRA, J. D. G. **Purificação e caracterização de uma  $\alpha$ -amilase de *Streptomyces* sp.** Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 1999.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: The roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium*

species cohesion and delineation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.34, p.29-54, 2005.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ, I. **Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas**. **Microbios em linea**. Disponível em: <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>. Acesso em: Set/2011.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, n.2, p.697-703, 1991.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, v.51, n.2, p.221-271, 1987.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, vol.173, p.2271-2277, 1991.

ZAIED, K. A.; EL-HADY, A. H.; AFIFY, A. H.; NASSEF, M. A. Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. **Journal of Biological Sciences**, v.4, p.344-358, 2003.

ZAKHAROVA E. A.; SCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, A. V.; SKRIPKO, N. G.; BULKHIN, N. S.; IGNATOY, V. V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal Biochemistry**, v.259, p.572-576, 1999.

ZAKHIA, F.; De LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v.25, p.569-576, 2001.

ZAPATA, F.; AMANN, H. <sup>32</sup>P isotopic techniques for evaluating the agronomic effectiveness of rock phosphate materials. **Fertilizer Research**, v.41, p.189-195, 1995.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; REIS, V. M., ALVES, G. C.; BALDANI, L. D.; CORDEIRO, A. C. **Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2007. 20p. (Embrapa Roraima. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 06).

## ANEXO I

### MEIOS DE CULTURA

#### *1. Meio YMA (VINCENT, 1970)*

Manitol	10 g
Fosfato de Potássio Dibásico 10%	1 mL
Fosfato de Potássio Monbásico 10%	4 mL
Sulfato de Magnésio 10%	2 mL
Cloreto de Sódio 10%	1 mL
Extrato de Levedura	0,4 g
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de Hidróxido de Potássio	5 mL
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

#### *2. Meio Mínimo (HUNGRIA et al., 1994)*

##### *2.1 Solução 1*

Fosfato de Amônio Monobásico	30 g
Fosfato de Potássio Monbásico	15 g
Fosfato de Amônio Dibásico	2,5 g
Cloreto de Sódio	2,5 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

##### *2.2 Solução 2*

Sulfato de Magnésio 1M

##### *2.3 Solução 3*

Ágar	22,5 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL



As três soluções foram autoclavadas separadamente a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente. A montagem foi feita com 199 mL da solução (1), 1 mL da solução (2), 800 mL da solução (3) e a fonte de carbono escolhida 1M.L<sup>-1</sup>.

*3. Meio Citrato Simmons (TEIXEIRA; FERREIRA; SANTOS, 2012)*

Citrato de Sódio	2 g
Sulfato de Magnésio	0,2 g
Fosfato de Amônio Monobásico	1 g
Fosfato de Potássio Dibásico	1 g
Cloreto de Sódio	5 g
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de Hidróxido de Potássio	15 mL
Ágar	20 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

*4. Meio Uréia (CHRISTENSEN, 2012)*

Peptona	1 g
Glicose	1 g
Cloreto de Sódio	5 g
Fosfato de Potássio Monobásico	2 g
Vermelho de Fenol	0,012 g
Ágar	14 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

5. Meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999)

Glicose	10 g
Fosfato Tricálcico	5 g
Cloreto de Magnésio	5 g
Sulfato de Magnésio	0,25 g
Cloreto de Potássio	0,2 g
Sulfato de Amônio	0,1 g
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

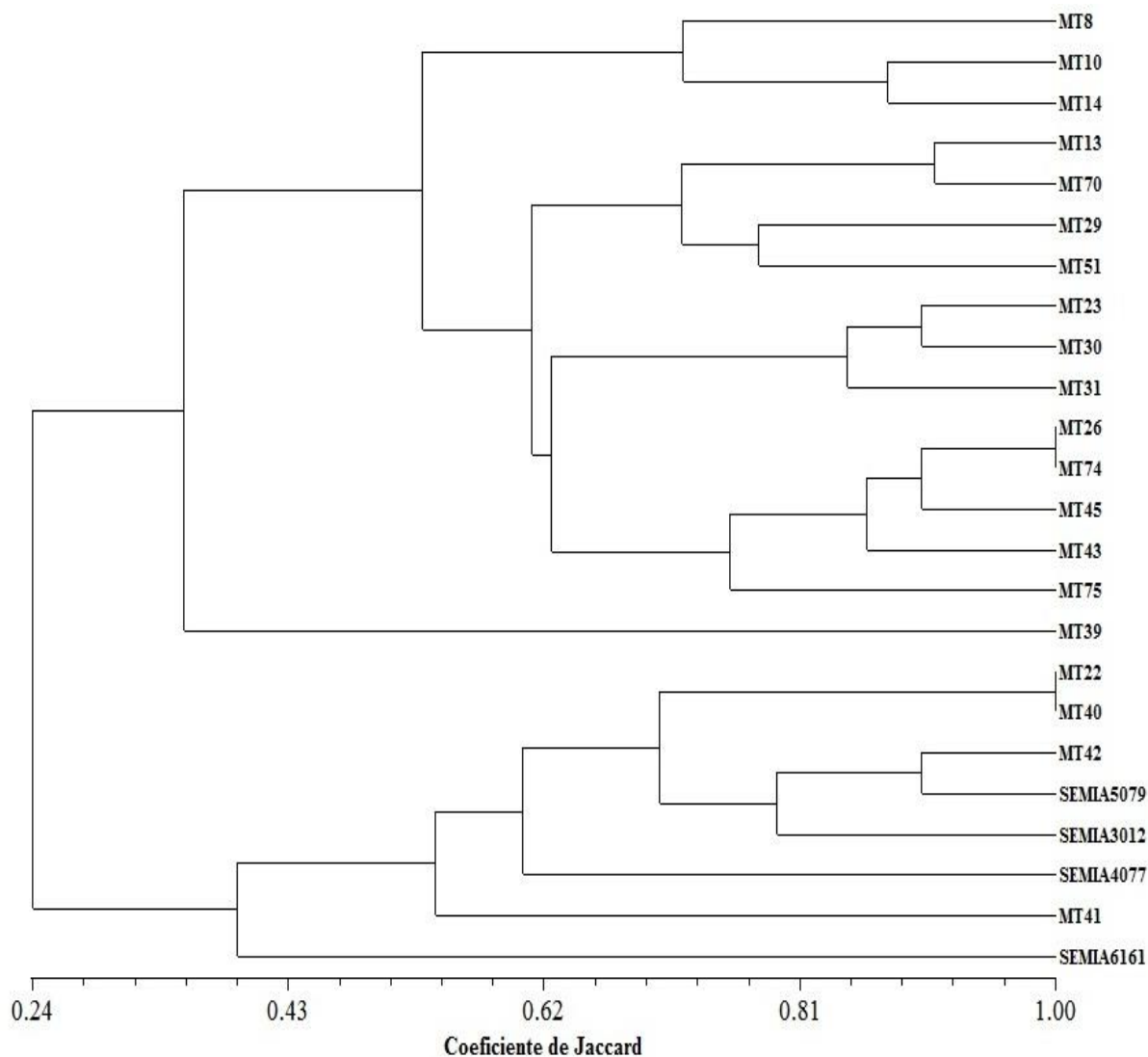
O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

6. Meio Pikovskaya (PIKOVSKAYA,

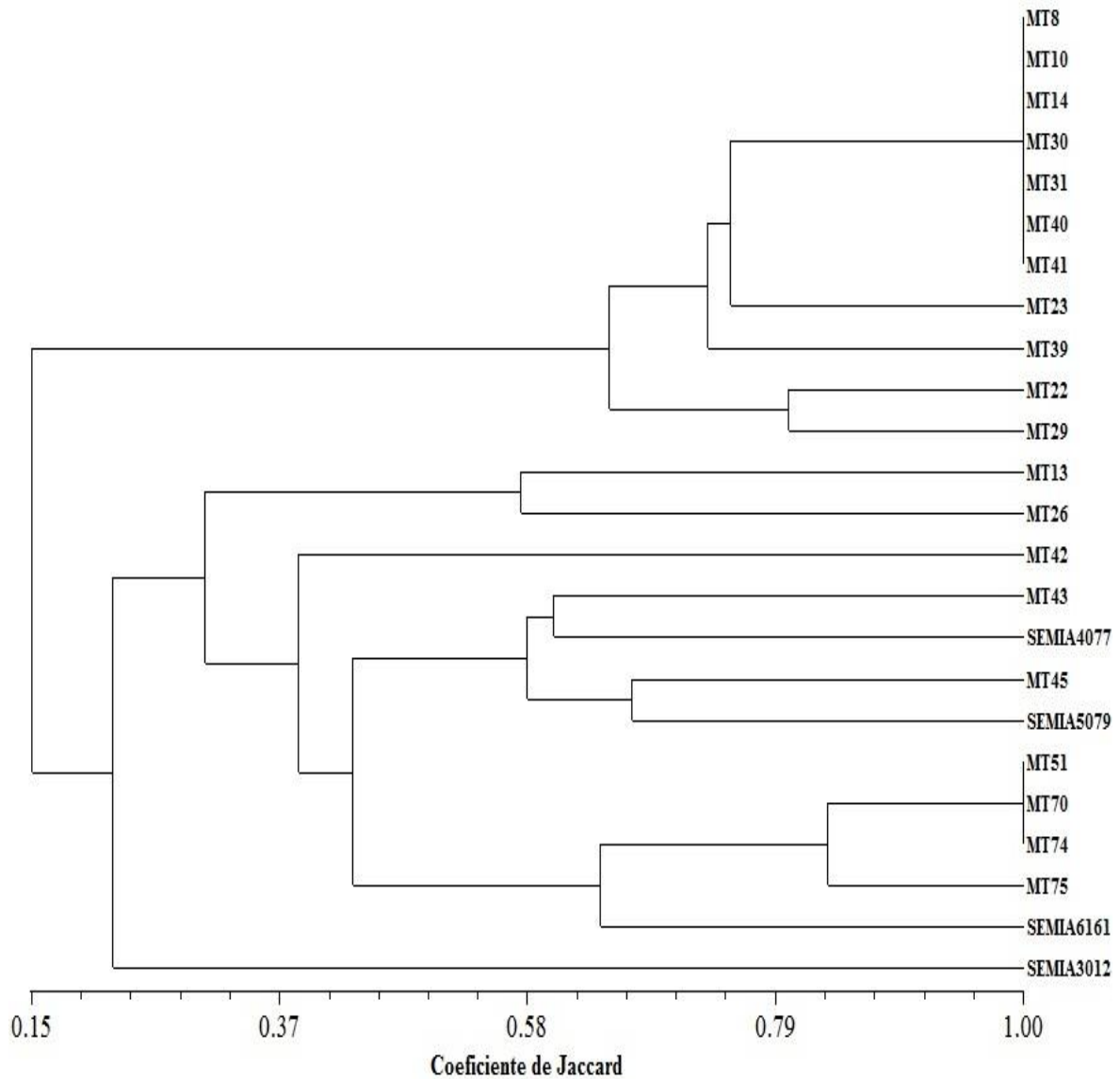
1948) Extrato de Levedura	0,5 g
Dextrose	10 g
Fosfato de Cálcio	5 g
Sulfato de Amônio	0,5 g
Cloreto de Potássio	0,2 g
Sulfato de Magnésio	0,1 g
Sulfato de Manganês	0,0001 g
Sulfato de Ferro	0,0001 g
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

## ANEXO II



**Figura 1:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard em função das características morfológicas e bioquímicas de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).



**Figura 2:** Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região BOX e intergênica 16S-23S rRNA por PCR de 20 bactérias isoladas de milho e 4 estirpes de referência SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).

### ANEXO III

**Tabela 4:** Crescimento bacteriano em 10 fontes de carbono.

<b>Bactérias</b>	<b>Ácido málico</b>	<b>Ácido maleico</b>	<b>Ácido nicotínico</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Frutose</b>	<b>Glicose</b>	<b>Manitol</b>	<b>Sacarose</b>	<b>Sorbitol</b>	<b>Mio-inositol</b>
<b>MT8</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT10</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT13</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT14</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT22</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT23</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT26</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT29</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT30</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT31</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT39</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT40</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT41</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT42</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT43</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT45</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT51</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT70</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT74</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>MT75</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SEMIA 5079</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SEMIA 6161</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SEMIA 4077</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>SEMIA 3012</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Crescimento, (-) Ausência de crescimento. Estirpes de referência: SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*), SEMIA 6161 (*Sinorhizobium freedii*), SEMIA 4077 (*Rhizobium tropici*) e SEMIA 3012 (*Rhizobium leguminosarum*).

