

**ISANELI BATISTA DOS SANTOS**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR:  
DIVERSIDADE GENÉTICA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL**

**FEVEREIRO - 2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR:  
DIVERSIDADE GENÉTICA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**ISANELI BATISTA DOS SANTOS**

**SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA**  
**Dra. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências da Pós Graduação em Produção Agrícola, para obtenção do título de *Mestre*.

**GARANHUNS**  
**PERNAMBUCO - BRASIL**  
**FEVEREIRO - 2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR:  
DIVERSIDADE GENÉTICA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**ISANELI BATISTA DOS SANTOS**

**GARANHUNS  
PERNAMBUCO - BRASIL  
FEVEREIRO - 2015**

## Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

S237b Santos, Isaneli Batista dos  
Bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar:  
diversidade genética e promoção de crescimento vegetal  
/ Isaneli Batista dos Santos. Garanhuns, 2015.

133 f.

Orientador: Júlia Kuklinsky Sobral  
Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola) -  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade  
Acadêmica de Garanhuns, 2015.

CDD: 581.31

1. Inoculação bacteriana
  2. Crescimento (Plantas)
  3. Mandioca - Melhoramento genético
- I. Sobral, Júlia Kuklinsky
  - II. Título

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR:  
DIVERSIDADE GENÉTICA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**ISANELI BATISTA DOS SANTOS**

**APROVADO EM: 10 DE FEVEREIRO DE 2015**

---

**Dra. Luciana Maia Moser**

(Professora Adjunta UFRPE – UAG)

---

*Maria Carolina Quecine Verdi*

**Dra. Maria Carolina Quecine Verdi**

(Professora Adjunta ESALQ-USP)

---

**Dra. Júlia Kuklinsky Sobral**

(Professora Adjunta UFRPE – UAG)

Daqui a alguns anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então solte suas amarras. Afaste-se do porto seguro. Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra!

(Mark Twain)

“A você que me deu a vida e me ensinou a vivê-la com dignidade e respeito, não bastaria um obrigado. A você, que iluminou os caminhos mais obscuros com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheios de esperança, não bastaria um muito obrigado. A você que se doou por inteira e renunciou os seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus, não bastaria um muitíssimo obrigado. A você, mãe por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais será traduzida por palavras. A você, minha querida e amada mãe, meu muito obrigado!”  
(Autor desconhecido)

Dedico,

À minha mãe Izabel Batista dos Santos, por todo empenho e esforço para que eu  
pudesse chegar até aqui!

## AGRADECIMENTOS

“Dêem graças ao Senhor, porque ele é bom.  
O seu amor dura para sempre!” Salmos 136:1

A minha eterna gratidão ao Pai Celestial, por sua misericórdia e imenso amor! Por me dar forças para vencer e nunca ter me desamparado. Graças te doou meu Deus, pelo dom da vida!

À minha querida e amada mãe “Belzinha”, obrigada por tudo, pelas renúncias, pelo esforço de me conduzir pelo caminho certo, por sempre ter focado na minha educação, mesmo diante de muitos obstáculos. Se eu cheguei até aqui foi por você!

Aos meus irmãos, Izanielle, Jamile e Júnior, agradeço por compartilhar todos os momentos e por estarem sempre comigo.

À minha família, por sempre apoiarem meus estudos e comemorarem junto comigo às conquistas alcançadas até aqui!

Ao meu amor Fabrício, por sempre está presente, por toda compreensão, amor e apoio.

À minha querida Orientadora, Prof. Júlia. Esse momento é o que mais difícil pra mim, pois como expressar com palavras, sentimento de tamanha gratidão, a uma pessoa que sempre me recebeu de sorriso aberto, com palavras de motivação e paciência? Não me canso de falar das suas qualidades profissionais e pessoais! Obrigada por dividir seus conhecimentos e suas experiências. Obrigada por sempre confiar em mim e por sempre me mostrar o lado bom das coisas, até mesmo nas piores situações. A senhora fez parte do meu amadurecimento profissional e pessoal, e serei eternamente grata por isso! Seus ensinamentos me fizeram descobrir como é doce e prazeroso fazer ciência, e, acredite, amo fazer isso! A ética e a delicadeza com que a senhora conduz a pesquisa são minha fonte de inspiração, as quais pretendo levá-las pra sempre comigo! Dizem que nunca estamos sós, e isso é verdade! É bom saber que temos amigos em que podemos confiar, isso, sem sombra de dúvidas nos encoraja para seguir em frente! Conforta-nos saber que temos pessoas que nos apoiam e nos acolhem com tanto carinho. É certo que passamos por momentos difíceis, mas comigo sempre estão os amigos, dando forças com palavras de conforto e ânimo. Sou grata a Deus por ter Lhe conhecido, pois além de uma orientadora e professora, encontrei uma pessoa que posso chamar de amiga!



Ao Prof. Alberto Araújo, por todas as conversas e conselhos científicos!

À minha segunda família, LGBM (Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana), Danubia, Tiago, Raquel, Jacyelle, Everthon, Lucianne, Marcos, Ricardo, Jesimiel, Caio, Yasmim e Claudineide, e egressos Flaviana, Williane, Gilka, Geraldo, Gessyka, Bruno, Adijailton e Camila. Cada um tem um espaço especial no meu coração. Jamais esquecerei a compreensão, união, carinho e disponibilidade em ajudar da família LGBM! Obrigada por me proporcionar momentos de diversão e alegria, e por sempre conduzirem a pesquisa com responsabilidade e entusiasmo!

À Embrapa Meio Ambiente e ao LMA (Laboratório de Microbiologia Ambiental) por ter dado a oportunidade de desenvolver parte dos meus experimentos de dissertação. Em especial ao Dr. Rodrigo Mendes, pela recepção, empenho e dedicação em me orientar durante o período que passei realizando os experimentos. À Márcia Parma, pela paciência e ternura com que conduz seu trabalho, obrigada pela paciência e por ter acompanhado todas as etapas do meu experimento com dedicação e entusiasmo. Obrigada pelas palavras de apoio e força que me deu quando me batia àquela saudade do “aconchego nordestino”!

Ao IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) pela concessão das sementes utilizadas nesta pesquisa.

Aos amigos que a vida me presenteou, Tiago, Raquel e Everthon, irmãos que a vida me deu! Sentirei saudades, mas sei que nossa amizade, apesar da distância, continuará firme e forte!

Ao meu amigo Arthur, por todo apoio e prova de amizade que tens dado até hoje!

À minha querida amiga-irmã, Flaviana. Você me mostrou que pessoas boas ainda existem, e você é prova disso. Sempre terei você como uma irmã, e serei eternamente grata a Deus, por te encontrado no meu caminho. Levarei sempre comigo sua amizade fiel e verdadeira!

Aos colegas do mestrado, ingressantes 2013.1, por todos os momentos de angústias e alegrias vividos! Não foi fácil, mas vencemos juntos e finalizamos mais essa etapa!

Aos docentes da Pós-Graduação em Produção agrícola, por todos os conhecimentos repassados durante essa caminhada.

À Dra. Luciana Maia, que desde a graduação me apoiou e incentivou. Tenha certeza, você fez parte, mesmo que indiretamente, de todas essas conquistas, pois seus conselhos foram essenciais para que eu continuasse seguindo na carreira acadêmica.

À minha futura orientadora, Dra. Carolina Quecine, por toda confiança depositada em mim e por acreditar no meu potencial. Obrigada por aceitar fazer parte desse momento!

À Unidade Acadêmica de Garanhuns/ Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de cursar o mestrado em Produção Agrícola, no interior do Estado de Pernambuco. Especialmente ao Coordenador Prof. Dr. Romualdo de Sousa, pela competência em que tem conduzido o PGPA.

À FACEPE pela concessão da bolsa e pelo auxílio mobilidade discente fornecido durante o período do mestrado.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho!

## **BIOGRAFIA**

Isaneli Batista dos Santos, filha de Izabel Batista da Silva e Ivan Soares do Santos, nasceu no dia 27 de julho de 1988, na cidade de Garanhuns – Pernambuco. No ano de 1995, ingressou no Ensino Fundamental I na Escola Municipal Professor Mário Matos, Garanhuns-PE. Em 1999, iniciou o Ensino Fundamental II e o Ensino Médio na Escola de Aplicação Professora Ivonita Alves Guerra (Garanhuns-PE), concluindo no ano de 2005. No ano de 2008, iniciou o curso de graduação em Bacharelado em Agronomia na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, concluindo no ano de 2012. No ano seguinte, ingressou no Mestrado em Produção Agrícola na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, concluído em fevereiro de 2015. No mês seguinte, dará início ao Doutorado em Microbiologia Agrícola pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	15
GENERAL SUMMARY	16
INTRODUÇÃO GERAL	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO I - DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BACTERIANOS ASSOCIADOS À PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM PLÂNTULAS DE SORGO FORRAGEIRO E MILHO	
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1. Isolados bacterianos	29
2.2. Seleção de isolados bacterianos fixadores de nitrogênio	30
2.3. Seleção de isolados bacterianos produtores de ácido indol acético (AIA) na presença de L-triptofano	30
2.4. Caracterização de isolados bacterianos produtores da molécula <i>quorum sensing</i>	31
2.5. Seleção de isolados bacterianos produtores de exopolissacarídeos (EPS)	31
2.6. Estudo da presença de isolados bacterianos pertencentes ao gênero <i>Burkholderia</i> através de PCR específica	32
2.7. Estudo da diversidade genética de isolados bacterianos associados à cana-de-açúcar através da técnica de BOX – PCR	33
2.8. Perfil de ácidos graxos de isolados bacterianos associados a cana- de-açúcar	34
2.9. Sequenciamento genético	36
2.10. Testes de germinação em sementes inoculadas com BPCV	38

2.11. Análise estatística	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1. Fixação biológica de nitrogênio por isolados bacterianos	41
3.2. Isolados bacterianos produtores de ácido indol acético (AIA)	44
3.3. Isolados bacterianos produtores da molécula <i>quorum sensing</i>	46
3.4. Isolados bacterianos produtores de exopolissacarídeos (EPS)	48
3.5. Detecção de isolados bacterianos pertencentes ao gênero <i>Burkholderia</i>	52
3.6. Análise da diversidade genética pela técnica de BOX – PCR	53
3.7. Análise do perfil de ácidos graxos e identificação de isolados bacterianos	55
3.8. Inoculação bacteriana em sementes de Sorgo e Milho	56
4. CONCLUSÕES	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

CAPÍTULO II - PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR  
LINHAGENS BACTERIANAS PERTENCENTES AO GÊNERO *Burkholderia*

RESUMO	75
ABSTRACT	76
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.1. Linhagens bacterianas	80
2.2. Avaliação da produção de ácido indol acético (AIA) sob diferentes fatores abióticos	81
2.3. Seleção de bactérias produtoras de exopolissacarídeo (EPS)	82
2.4. Caracterização de bactérias produtoras de moléculas <i>quorum sensing</i> (QS)	83
2.5. Estudo da diversidade bacteriana por meio da técnica de REP – PCR ( <i>Repetitive Extragenic Palindromic elements</i> )	83
2.6. Identificação das linhagens bacterianas a partir do sequenciamento parcial do 16s rDNA	85

2.7. Testes de germinação em sementes de milho inoculadas com BPCV	85
2.8. Análise estatística	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1. Produção de ácido indol acético (AIA) sob a presença e ausência de L-triptofano	87
3.2. Produção de AIA sob influência de pH ácido e básico	89
3.3. Produção de ácido indol acético (AIA) sob influência da salinidade	90
3.4. Produção de exopolissacarídeo (EPS)	92
3.5. Bactérias produtoras da molécula <i>quorum sensing</i> (QS)	94
3.6. Diversidade genética de linhagens bacterianas pertencentes ao gênero <i>Burkholderia</i> .	96
3.7. Identificação das linhagens bacterianas	99
3.8. Inoculação bacteriana em sementes de milho	100
4. CONCLUSÕES	103
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

CAPÍTULO III - EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOB O CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO (*Zea mays*) INOCULADAS COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

RESUMO	116
ABSTRACT	117
1. INTRODUÇÃO	118
2. MATERIAIS E MÉTODOS	120
2.1. Testes de germinação em sementes de milho inoculadas com BPCV	120
2.2. Análise estatística	121
3. RESULTADOS	122
3.1. Efeitos da salinidade em sementes de milho inoculadas com BPCV	122
4. CONCLUSÕES	129
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

## RESUMO GERAL

As BPCV podem estimular o crescimento da planta, reduzir a ocorrência de infecções causadas por fitopatógenos, e ainda diminuir os efeitos de estresses bióticos ou abióticos sob as plantas. Logo, o objetivo geral deste trabalho foi identificar os mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal em milho (*Zea mays* L.) e em sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*), e estudar a diversidade genética de bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar e mandioca. A seleção de isolados bacterianos com mecanismos de promoção de crescimento vegetal foi realizada através dos testes de fixação biológica de nitrogênio (FBN) na ausência e presença de 2,5% de NaCl; síntese de ácido indol acético (AIA) sob a presença de diferentes fatores abióticos; expressão da molécula *quorum sensing* (ALH) e produção de exopolissacarídeos (EPS). O estudo da diversidade genética foi realizado através das técnicas de BOX-PCR e REP-PCR; e, a presença de isolados pertencentes ao gênero *Burkholderia* por meio de PCR específica. As bactérias positivas para os diversos mecanismos de promoção foram submetidas ao perfil de ácidos graxos e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Em seguida, foi feita a inoculação de BPCV em sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. Ipa 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José) para avaliar o desempenho de tais bactérias sobre a promoção vegetal, inclusive sob condições de estresse salino. Os resultados mostraram que todas as bactérias foram positivas para a FBN e síntese de AIA; 87,04% dos isolados foram positivos para a produção de *quorum sensing* (ALH), enquanto que 92,30% das linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*, foram positivas ao teste; 7,40% das bactérias foram negativas à produção de EPS, nenhum isolado bacteriano apresentou pouca produção, 20,37% dos isolados tiveram média e 72,22% tiveram alta produção. Em relação às linhagens *Burkholderia*, 38,46% das linhagens avaliadas foram negativas ao teste; apenas a linhagem UAGC131 obteve halo de produção menor que 10 mm de diâmetro (pouca produção), o que corresponde a 3,85% da frequência relativa; 19,23% tiveram média e 38,46% apresentaram alta produção de EPS. A PCR específica revelou que dos isolados avaliados, apenas UAGF01 e UAGF09, tiveram a presença de banda, sendo, portanto, pertencentes ao gênero *Burkholderia*. A técnica de BOX-PCR evidenciou a presença de 41 grupos (*clusters*), com alta variabilidade genética entre os isolados bacterianos avaliados. O coeficiente de similaridade de *Jaccard*, através da técnica de REP-PCR, evidenciou a presença de 17 grupos (*clusters*), com alta variabilidade genética entre as linhagens avaliadas, a 30% de similaridade. O estudo do perfil de ácidos graxos e a identificação genética a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, mostrou a presença de diversos gêneros bacterianos de grande importância nos estudos de promoção de crescimento vegetal, como *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea*. As bactérias avaliadas promoveram aumento de pelo menos uma característica seja por meio do IVG, ou PC, ou comprimento de radícula, parte aérea e total, ou fitomassa total fresca e seca das plântulas de sorgo ou milho, inclusive sob condições de estresse salino. Esses resultados mostraram que as bactérias avaliadas possuem potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal em condições laboratoriais, necessitando, portanto, de testes em ambiente protegido e em campo para confirmar o potencial dessas bactérias.

Palavras-chave: inoculação bacteriana, nichos de colonização, promoção de crescimento vegetal, mecanismos diretos

## GENERAL SUMMARY

The BPCV can stimulate the growth of the plant, reduce the occurrence of infections caused by plant pathogens and still reduce the effects of biotic or abiotic stresses in plants. Therefore, the goal of this work was to identify the direct mechanisms of plant growth promotion in maize and sorghum, and study the genetic diversity of bacteria associated with cane sugar plants and manioc. The selection of bacterial isolates of plant growth promoting mechanisms were performed using biological nitrogen fixation test (BNF) in the absence and presence of 2.5% NaCl; indole acetic acid synthesis (IAA) in the presence of different abiotic factors; expression of quorum sensing molecule (HLA) and exopolysaccharide (EPS). The genetic diversity study was conducted through the BOX-PCR and REP-PCR techniques; and the presence of isolates belonging to the genus *Burkholderia* by specific PCR. Positive bacteria for different promotion mechanisms were submitted to the fatty acids profile and partial sequencing of the 16S rRNA gene. Then, the BPCV inoculation was done in sorghum seeds (*Sorghum vulgare* var. Ipa 467-4-2) and corn (*Zea mays* var. St Joseph) to assess the performance of such bacteria on promoting plant, even under salt stress. The results showed that all bacteria were positive for IAA and BNF synthesis; 87.04% of the isolates tested positive for the production of quorum sensing (HLA), while 92.30% of bacterial strains belonging to the genus *Burkholderia*, the test was positive; 7.40% of the bacteria were negative for EPS production, no bacterial isolate showed little EPS production, 20,37% of the isolates had average production of EPS and 72,22% had high production of EPS. In relation to *Burkholderia* lineages, 38.46% of tested strains were negative to the test; UAGC131 strain had only minor production of halo 10 mm diameter (low output), which corresponds to 3.85% of relative frequency; 19.23% had average production of EPS and 38.46% had high production of EPS. The specific PCR revealed that the isolates, only UAGF01 and UAGF09, had the presence of band, and therefore belonging to the genus *Burkholderia*. The BOX-PCR revealed the presence of 41 groups (*clusters*) with high genetic variability among the evaluated bacterial isolates. The Jaccard similarity coefficient by REP-PCR, revealed the presence of 17 groups (*clusters*) with high genetic variability between strains evaluated, 30% similarity. The fatty acids profile of the study and the genetic identification from the partial sequencing of the 16S rRNA gene showed the presence of several bacterial genera of great importance in the promotion of studies of plant growth, as *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea* and *Klebsiella*. The bacteria assessed promoted increase of at least one feature or through the IVG, or PC, or radicle, shoot and total, or total fresh and dry phytomass of seedlings of sorghum or maize, even under salt stress. These results showed that the bacteria have evaluated biotechnological potential for plant growth promotion in laboratory conditions, requiring therefore tests in greenhouse and field to confirm the potential of these bacteria.

Keywords: bacterial inoculation, colonization niches, plant growth promotion, direct mechanisms



## INTRODUÇÃO GERAL

A maioria dos solos agrícolas não possui quantidade suficiente de nutrientes para o desenvolvimento dos vegetais, tais como o nitrogênio e fósforo. Para minimizar este problema e obter rendimentos elevados, agricultores estão cada vez mais dependentes de adubos nitrogenados e ricos em fósforo (GLICK, 2012). Essa dependência, além de ser cara e não renovável apresenta riscos aos seres vivos e ao ambiente. Assim, surge como alternativa sustentável, o uso de micro-organismos, aplicados como biofertilizantes e agentes de controle biológico (SILVA et al., 2013).

Na natureza, as bactérias são encontradas em associação com diferentes espécies vegetais e animais, além do solo, de forma benéfica ou não (ANDREOTE et al., 2009). Devido às plantas serem um sistema complexo em que as comunidades bacterianas interagem continuamente, de acordo com a proximidade e intimidade com a raiz, as bactérias podem ser classificadas como: bactérias de vida livre ou bactérias que vivem no solo ao redor das raízes (rizosfera), sendo as quais utilizam metabólitos liberados pelo sistema radicular, como fonte de carbono; bactérias epifíticas ou as que colonizam a superfície radicular (rizoplano), que têm a colonização influenciada por fatores biológicos; e, bactérias endofíticas que colonizam o interior do tecido radicular, sem causar danos ao hospedeiro (CASTANHEIRA et al., 2014; JOSHI & NONGKHLAW, 2014).

Dentre as bactérias que apresentam interação benéfica com a planta hospedeira, estão as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que podem beneficiar o desenvolvimento das plantas por meio de vários mecanismos de ação, sejam eles, a aquisição de qualquer recurso facilitador (nitrogênio, fósforo e minerais essenciais), ou modulação dos níveis dos hormônios vegetais, ou ainda através da redução dos efeitos inibitórios de vários fitopatógenos, na forma de agentes de controle biológico (GLICK, 2012).

A fixação biológica de nitrogênio representa cerca de 2/3 do nitrogênio fixado no mundo, e, surge como alternativa ecológica aos fertilizantes químicos e como uma prática economicamente benéfica e viável. As bactérias que transformam o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em formas absorvíveis pela planta são ditas diazotróficas (AHEMAD & KIBRET, 2014). Muitos são os estudos que relatam o incremento da produção

vegetal, a partir da inoculação de plantas com bactérias diazotróficas, como o de Boddey et al. (2003) que citam aumento da produção na cultura de cana-de-açúcar entre 7,1% e 31,9%. Beneduzi et al. (2013) reforçam que o potencial desses microorganismos é tão elevado que, em determinadas culturas, estas bactérias são capazes de suprir plenamente as necessidades das plantas para o nitrogênio, permitindo obter altos rendimentos.

Ainda nesse contexto, a solubilização de fósforo inorgânico (Pi) por bactérias ditas solubilizadoras de fosfato (PSB) vem se destacando no mundo todo. Essas bactérias são capazes de liberar fósforo em formas assimiláveis pelas plantas, por meio da produção de ácidos orgânicos, ácidos minerais, substâncias húmicas, dentre outras (PEI-XIANG et al., 2012). Devido ao fato do P ser um macronutriente essencial para as plantas, a utilização de PSB tem desempenhado papel vital no desenvolvimento dos vegetais (GUANG-CAN et al., 2008), sendo, portanto, uma opção para aumentar a eficiência de adubos fosfatados, ou até sua substituição, diminuindo, conseqüentemente, os custos de produção (BARROSO & NAHAS, 2008).

A síntese de reguladores de crescimento vegetal (fitohormônios) é mais uma característica que as BPCV podem desempenhar quando associadas às plantas. Um dos fitohormônios mais ativos e caracterizados é o ácido indol acético (AIA), pertencente à classe das auxinas (SADEGHI et al., 2012). O AIA é sintetizado por várias rotas bioquímicas, mas a principal utilizada pelas bactérias é a via dependente de triptofano. Logo, a presença deste aminoácido é responsável por promover o aumento da síntese deste fitohormônio (LEITE, 2012).

Geralmente, a síntese de AIA afeta a divisão celular das plantas, extensão e diferenciação; estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta a taxa de desenvolvimento radicular; controla os processos de crescimento vegetativo e inicialização do enraizamento; medeiam respostas à luz, gravidade e florescimento, dentre outros (AHEMAD & KIBRET, 2014). Entretanto, a resposta das plantas ao AIA produzido por bactérias, pode variar de efeitos benéficos a deletérios, dependendo de sua concentração, por isso, se faz necessária a caracterização de bactérias produtoras de AIA para conhecer seus verdadeiros efeitos sob o crescimento vegetal (GLICK, 2012).

Muitas espécies de bactérias possuem a capacidade de sintetizar e excretar polissacarídeos (EPS – exopolissacarídeos). Uma vez transportada para o meio

extracelular, o EPS surge como polímeros solúveis ou insolúveis, que se aderem fracamente à superfície da célula, proporcionando proteção às plantas a diferentes estresses, como dessecação, predação e efeitos dos antibióticos (CASTELLANE et al., 2014).

*Quorum sensing* (QS) é um tipo de comunicação apresentado por bactérias, para detectar a densidade de uma subpopulação. Esse mecanismo foi descrito pela primeira vez em *Vibrio fischeri*, uma bactéria produtora de bioluminescência em alta densidade celular (RAMÍREZ-MATA et al., 2014). Segundo Quecine et al. (2012) o sistema QS mais estudado é o inicializado pela molécula AHL (N-acil homosserina lactona), a qual está envolvida no controle da expressão de colonização de eucariotos por diversas espécies bacterianas. Essa colonização é facilitada pela formação de biofilmes, a qual vem sendo considerada uma resposta ao mecanismo QS (RUNJANEK et al., 2004). São diversos os benefícios que a síntese de biofilme traz às comunidades microbianas, podendo citar: melhor comunicação entre as células e colonização à planta hospedeira (LEITE et al., 2014). Assim, bactérias produtoras de EPS e QS, são ótimas candidatas para a produção de inoculantes agrícolas, visto que, a colonização dessas bactérias se torna mais fácil, devido à presença dessas duas substâncias.

Os micro-organismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos e desempenham funções importantes nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento dos ecossistemas (SILVA, 2010). Entretanto, apenas 5% dessa biodiversidade foi identificada, caracterizada e descrita na literatura devido à dificuldade de cultivo da maioria das espécies (PROSSER et al., 2007).

Contudo, a evolução das técnicas de biologia molecular tornou possível aprimorar as análises da diversidade microbiana. A maioria das técnicas de biologia molecular para estudar a diversidade de micro-organismos, especialmente bactérias, são baseadas em análises de genes de RNA ribossômico (rRNA), a qual permite descobrir e entender a relação entre a diversidade estrutural e funcional desses ecossistemas (TORSVIK et al., 2002). Assim, o estudo da diversidade bacteriana em diferentes ecossistemas é essencial para o entendimento da interação entre bactéria/planta, pois auxiliam seu uso na agricultura sustentável (PROSSER et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se de forma geral, através do estudo, selecionar bactérias com características de promoção de crescimento vegetal, analisar a

diversidade genética e testar o potencial de tais bactérias, como possível inoculante agrícola em sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. Ipa 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 417-432, 2009.

BARROSO, C.B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.529-535, 2008.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., ALVES, B.J.R., REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant Soil**, v. 252, p. 139–149, 2003.

CASTANHEIRA, C.; DOURADO, A. C.; ALVES, P. I.; CORTÉS-PALLERO, A. M.; DELGADO-RODRÍGUEZ, I. D.; PRAZERES, A.; BORGES, N.; SÁNCHEZ, C.; CRESPO, M. T. B.; FARELEIRA, P. Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. **Microbiological Research**, v. 169, n. 9-10, p. 768-79, 2014.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191 – 191, 2014.

GLICK B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1 -16, 2012.

GUANG-CAN, T.; SHU-JUN, T.; MIAO-YING, C.; GUANG-HUI, X. Phosphate - Solubilizing and -Mineralizing Abilities of Bacteria Isolated from Soils. **Pedosphere**, v.18, n. 4, p. 515–523, 2008.

JOSHI, S. R.; NONGKHLAW, F. M. W. Distribution pattern analysis of epiphytic bacteria on ethnomedicinal plant surfaces: A micrographical and molecular approach. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 2, p. 34 – 40, 2014.

LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, (Suplemento), p. S73–S79, 2014.

LEITE, M. C. B. S. **Bactérias halotolerantes associadas a plantas de cana-de-açúcar em solos da zona da mata de Pernambuco**. 91 p. 2012. Dissertação (Mestrado). Pós Graduação em Produção Agrícola - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns.

PEI-XIANG, Y.; LI, M.; MING-HUI, C.; JIA-QIN, X.; FENG, H.; CHANG-QUN, D.; MING-HE, M.; DUN-HUANG, F.; YAN-QING, D.; FA-XIANG, Y. Phosphate Solubilizing Ability and Phylogenetic Diversity of Bacteria from P-Rich Soils Around Dianchi Lake Drainage Area of China. **Pedosphere**, v.22, n. 5, p. 707–716, 2012.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLEON, R. P.; FREEN, J. L.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. Essay the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews microbiology**, v. 5, n. 5, p. 384 – 392, 2007.

QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; ROSSETTO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVAL, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7511-7518, 2012.

RAMÍREZ-MATA, A.; FERNÁNDEZ – DOMINGUEZ, I. J.; NUÑEZ-REZA, K. J.; XIQUI-VÁZQUEZ, M. L.; BACA, B. E. Redes de señalización em la producción de biopelículas em bacterias: *quorum sensing*, di – GMP y óxido nítrico. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 3, p. 242-255, 2014.

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. **Biociencia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 35-50, 2004.

SADEGHI, A.; KARIMI, E.; DAHAJI, P.A.; JAVID, M.G.; DALVAND, Y.; ASKARI, H. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1503-1509, 2012.

SILVA, M. C. P., FIGUEIREDO, A. F., ANDREOTE, F. D., CARDOSO, E. J. B. N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 19, p. 163 – 171, 2013.

SILVA, M. C. P. **Seleção de estirpes eficientes para fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em plantas da espécie *Brachiaria brizantha***. 80 p. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP/ESALQ.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from gene to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

---

---

**CAPÍTULO I**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS BACTERIANOS ASSOCIADOS À  
PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO  
VEGETAL EM PLÂNTULAS DE SORGO FORRAGEIRO E MILHO**

---

---



## RESUMO

O uso de BPCV torna-se uma alternativa viável e economicamente eficaz para reduzir o uso de fertilizantes químicos em diferentes cultivos agrícolas. Essas bactérias podem estimular o crescimento das plantas, reduzir a ocorrência de infecções causadas por fitopatógenos, e ainda diminuir os efeitos de estresses bióticos ou abióticos sob as plantas. Logo, objetivou-se identificar os mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal em milho (*Zea mays* L.) e em sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*), estudar a diversidade genética de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato inorgânico associados a diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas no Estado de Pernambuco. A seleção de isolados bacterianos com mecanismos de promoção de crescimento vegetal foi realizada através dos testes de fixação biológica de nitrogênio (FBN) na ausência e presença de 2,5% de NaCl; síntese de ácido indol acético (AIA) sob a presença de L-triptofano; expressão da molécula *quorum sensing* (ALH) e produção de exopolissacarídeos (EPS). O estudo da diversidade genética foi realizado através da técnica de BOX-PCR e a presença de isolados pertencentes ao gênero *Burkholderia* por meio de PCR específica. As bactérias positivas para os diversos mecanismos de promoção foram submetidas ao perfil de ácidos graxos e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Em seguida, foi feita a inoculação de BPCV em sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. Ipa 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José) para avaliação do desempenho da promoção vegetal pelas bactérias. Os resultados indicaram que todos os isolados foram positivos para a FBN e síntese de AIA; 87,04% dos isolados foram positivos para a produção de *quorum sensing* (ALH); 7,40% das bactérias foram negativas quanto à produção de EPS, nenhum isolado bacteriano apresentou pouca produção de EPS, 20,37% dos isolados tiveram média produção de EPS e 72,22% tiveram alta produção de EPS. A PCR específica revelou que dos isolados avaliados, apenas UAGF01 e UAGF09, tiveram a presença de banda, sendo, portanto, pertencentes ao gênero *Burkholderia*. A técnica de BOX-PCR evidenciou a presença de 41 grupos (*clusters*), com alta variabilidade genética entre os isolados bacterianos avaliados. O estudo do perfil de ácidos graxos e a identificação genética mostraram a presença de diversos gêneros bacterianos de grande importância nos estudos de promoção de crescimento vegetal, como *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea*. A inoculação bacteriana em sementes de sorgo forrageiro não influenciou o IVG. Entretanto, aumentou a PC, chegando a alcançar 100% com a inoculação das bactérias UAGF18 e UAGF46; favoreceu o comprimento de radícula, cujo maior valor foi obtido com as bactérias UAGF25 (19,228 cm); parte aérea com o isolados UAGF18 (8,929 cm); total com a presença da bactéria UAGF25 (17,391 cm); fitomassa total fresca (UAGF18 – 0,103 g) e seca (0,020 g). Esses resultados indicaram isolados bacterianos associados à cana-de-açúcar com potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal em condições laboratoriais, necessitando, portanto, de testes em ambiente protegido e em campo para confirmar o potencial dessas bactérias.

Palavras-chave: mecanismos diretos; inoculação bacteriana; sorgo forrageiro; milho

## ABSTRACT

The use of BPCV becomes a viable and economically effective alternative to reduce the use of chemical fertilizers in different agricultural cultivation. The BPCV can stimulate the growth of the plant, reduce the incidence of infections caused by phytopathogens and still diminish the effects of biotic or abiotic stresses in plants. Therefore, the objective of this work was to identify the direct mechanisms of plant growth promotion in maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum vulgare*), and study the genetic diversity of inorganic phosphate-solubilizing bacterial isolates associated with different varieties of cane (*Saccharum* sp.) cultivated in the state of Pernambuco. The selection of bacterial isolates of plant growth promoting mechanisms were performed using biological nitrogen fixation test (BNF) in absence and presence of 2.5% NaCl; Synthesis of indole acetic acid (IAA) in the presence of L-tryptophan; expression of quorum sensing molecule (HLA) and exopolysaccharide (EPS). The study of genetic diversity was performed through the BOX-PCR and the presence of isolates belonging to the genus *Burkholderia* by specific PCR. Positive bacteria for the various promotion mechanisms were submitted to the fatty acid profile of and partial sequencing of the 16S rRNA gene. Then, the BPCV inoculation was done in sorghum seeds (*Sorghum vulgare* var. Ipa 467-4-2) and maize (*Zea mays* var. Sao Jose) to assess the performance of such bacteria on promoting plant. The results showed that all isolates were positive for IAA and BNF synthesis; 87.04% of the isolates tested positive for the production of quorum sensing (ALH); 7.40% of the bacteria were negative about the EPS production, no bacterial isolate showed little EPS production, 20.37% of the isolates have had average production of EPS and 72.22% had high production of EPS. The specific PCR revealed that the isolates, only UAGF01 and UAGF09, had the presence of band, and therefore belonging to the genus *Burkholderia*. The BOX-PCR revealed the presence of 41 groups (*clusters*) with high genetic variability between the evaluated bacterial isolates. The fatty acids profile of the study and the genetic identification from the partial sequencing of the 16S rRNA gene showed the presence of several bacterial genera of great importance in the promotion of studies of plant growth, as *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea* and *Klebsiella*. Bacterial inoculation of forage sorghum seeds did not influence the IVG. However, increased PC, reaching 100% with the inoculation of UAGF18 and UAGF46 bacteria; favored the radicle, whose highest value was obtained with the UAGF25 bacteria (19.228 cm); shoots with UAGF18 isolated (8.929 cm); Total with the presence of bacteria UAGF25 (17.391 cm); total fresh biomass (UAGF18 - 0.103 g) and dry (0.020 g). These results showed bacterial isolates associated with cane sugar have biotechnological potential for plant growth promotion in laboratory conditions, requiring therefore tests in greenhouse and field to confirm the potential of these bacteria.

Keywords: direct mechanisms; bacterial inoculation; sorghum; maize

## 1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é o setor mais importante da economia nacional brasileira, correspondendo a 23% do PIB do país (GOMES & BORÉM, 2012). O Brasil apresenta perspectivas satisfatórias para o agronegócio, em face de suas características e diversidades, tanto de clima quanto de solo (PACHECO et al., 2012). Com o aumento da demografia mundial e, conseqüentemente, da demanda por alimentos, estima-se que o Brasil alcançará o patamar de líder mundial no fornecimento de alimentos e *commodities* ligadas ao agronegócio (GOMES & BORÉM, 2012).

O milho (*Zea mays* L.), por ser uma *commoditie*, é um dos cereais mais importantes do mundo, devido a versatilidade de aplicações, podendo ser destinado tanto para o consumo humano quanto para o consumo animal (TAKASU et al., 2014). Estudos mostram que para produzir 1 t ha<sup>-1</sup> de milho é necessário de 9 a 11 kg de fertilizante nitrogenado, sendo que desse total, apenas 50% é utilizado pelas plantas. A baixa eficiência de uso do nitrogênio contribui para a contaminação dos solos e lençóis freáticos, comprometendo a sustentabilidade da agricultura, além de elevar os custos de produção (MONTAÑEZ et al., 2012).

A cultura do sorgo também tem sua importância no Agronegócio Brasileiro. O cultivo do sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*) permite obter altos rendimentos de forragem, com qualidade comparável a de outras culturas, como a do milho, e com a vantagem de menor suscetibilidade aos estresses climáticos. Estima-se que a cultura do sorgo para forragem no Brasil, ocupe cerca de 35% da área total cultivada com esta espécie, tornando-se uma grande alternativa para a produção de forragem (RODRIGUES et al., 2014). Segundo dados da Embrapa Milho e Sorgo (2008), a extração de nutrientes pela cultura aumenta linearmente com o aumento da produtividade, sendo que o nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo são os elementos requeridos em maiores quantidades.

Diante do exposto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) torna-se uma alternativa viável e economicamente eficaz para reduzir o uso de fertilizantes químicos em diferentes cultivos agrícolas. As BPCV podem estimular o crescimento da planta, reduzir a ocorrência de infecções causadas por fitopatógenos, e

ainda diminuir os efeitos de estresses bióticos ou abióticos sob as plantas (COMPANT et al., 2010).

Vários são os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por bactérias como: fixação biológica de nitrogênio (PEREIRA et al., 2012), solubilização de fosfato (SANTOS et al., 2012), produção de fitohormônios, sideróforos (BENEDUZI et al., 2013) e exopolissacarídeos, dentre outros (KAVAMURA et al., 2013). Podendo citar ainda o ajustamento osmótico, a regulação de abertura e fechamento de estômatos, modificação da morfologia das raízes, aumento da eficiência de obtenção de minerais e alteração no metabolismo de acumulação de nitrogênio (COMPANT et al., 2005). Portanto, devido às suas características múltiplas, a busca por novas BPCV torna-se interessante, uma vez que elas podem ser utilizadas como inoculos para biofertilizantes, fitoestimulação e biocontrole na agricultura, silvicultura e recuperação de áreas ambientais (KAVAMURA et al., 2013). Entretanto, para se obter resultados satisfatórios com a inoculação de BPCV, se faz necessário garantir uma colonização eficiente das bactérias na planta, sendo essa etapa a mais importante para se alcançar os efeitos pretendidos (BASHAN et al., 2014).

Nesse contexto, objetivou-se neste trabalho, identificar os mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal em milho (*Zea mays* L.) e em sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*), e estudar a diversidade genética de isolados bacterianos associados à diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas no Estado de Pernambuco.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Isolados bacterianos

Os cinquenta e quatro isolados bacterianos utilizados são provenientes da associação com plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), de diferentes variedades e diferentes nichos (rizosfera: RIZ e endofítica de raiz: ER). Os isolados fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica de Garanhuns, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LGBM/UAG/UFRPE) e foram caracterizados como solubilizadores de fosfato inorgânico, *in vitro*, de acordo com Santos (2013) - Tabela 1.

**Tabela 1.** Origem de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato inorgânico, *in vitro*, associadas a plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.).

Isolado Bacteriano	Variedade	Nicho	SFPI		Isolado Bacteriano	Variedade	Nicho	SFPI	
			pH					pH	
			7,2	5,5				7,2	5,5
UAGF01	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF30	RB 92579	ER	+	+
UAGF02	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF31	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF04	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF32	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF05	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF33	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF06	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF35	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF07	RB 92579	RIZ	+	-	UAGF36	RB 867515	RIZ	-	-
UAGF09	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF37	RB 867515	RIZ	-	-
UAGF10	RB 92579	RIZ	-	-	UAGF39	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF11	RB 92579	RIZ	-	-	UAGF40	RB 867515	RIZ	-	-
UAGF12	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF41	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF13	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF42	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF14	RB 92579	RIZ	+	+	UAGF44	RB 867515	RIZ	+	+
UAGF15	RB 92579	RIZ	+	-	UAGF46	RB 867515	ER	+	+
UAGF16	RB 92579	ER	+	+	UAGF47	RB 867515	ER	+	+
UAGF17	RB 92579	ER	+	+	UAGF48	RB 867515	ER	+	+
UAGF18	RB 92579	ER	+	+	UAGF49	RB 867515	ER	+	+
UAGF19	RB 92579	ER	+	+	UAGF50	RB 867515	ER	+	+
UAGF20	RB 92579	ER	+	+	UAGF51	RB 867515	ER	+	+
UAGF21	RB 92579	ER	+	+	UAGF52	RB 867515	ER	+	+
UAGF22	RB 92579	ER	+	+	UAGF53	RB 867515	ER	+	+
UAGF23	RB 92579	ER	+	+	UAGF54	RB 867515	ER	+	+
UAGF24	RB 92579	ER	+	+	UAGF55	RB 867515	ER	+	+
UAGF25	RB 92579	ER	+	+	UAGF56	RB 867515	ER	+	+
UAGF26	RB 92579	ER	+	+	UAGF57	RB 867515	ER	+	+
UAGF27	RB 92579	ER	+	+	UAGF58	RB 867515	ER	+	+
UAGF28	RB 92579	ER	+	+	UAGF59	RB 867515	ER	+	+

UAGF29 RB 92579 ER + + UAGF60 RB 867515 ER + +

---

**Fonte:** Santos (2013). SFPi: Solubilização de fosfato inorgânico

## **2.2. Seleção de isolados bacterianos fixadores de nitrogênio**

A seleção de isolados bacterianos potencialmente fixadores de nitrogênio atmosférico foi realizada através da inoculação de 10 µl do inoculo bacteriano, obtidos a partir de colônias isoladas, em meio semi-sólido NFb, livre de fonte nitrogenada (DOBEREINER et al., 1995), sob diferentes concentrações de NaCl (0 e 2,5%), a 28°C por 11 dias. Os experimentos foram realizados em duplicatas e o resultado positivo foi caracterizado pela formação de um halo horizontal no interior do meio de cultura.

## **2.3. Seleção de isolados bacterianos produtores de ácido indol acético (AIA) na presença de L-triptofano**

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à produção de ácido indol acético (AIA) sob a presença do precursor L-triptofano, *in vitro*, por meio do método colorimétrico e específico que caracteriza a produção deste fitormônio (CROZIER et al., 1988).

Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio TSA sólido 10% (*Trypcase Soy Agar*), após 24 horas, foram coletadas colônias isoladas e estas foram inoculadas em meio líquido TSA 10% sem triptofano, as quais permaneceram sob agitação constante (125 rpm), por 24 horas. Em seguida, foram transferidos 10 µL do inoculo bacteriano para tubos contendo meio líquido TSA 10% acrescido de 5 mM de triptofano (presença do precursor), estes, mais uma vez, foram mantidos sob agitação constante (125 rpm) durante 24 horas.

Posteriormente, 2 mL da cultura foram centrifugados a uma rotação de 12000 g por 5 minutos. Ao término da centrifugação, 1,4 mL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo acrescido de 0,6 mL do reagente Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub>, 0,5M em 34% de ácido perclórico), permanecendo no escuro, a 28°C, por 30 minutos. O resultado positivo foi caracterizado pela formação da coloração rósea. As amostras foram avaliadas em espectrofotômetro, sendo as absorbâncias medidas a 530 nm e, para a conversão das leituras foi utilizada uma curva padrão (BARBOSA, 2010), a partir de uma solução de AIA de diferentes concentrações. O experimento foi conduzido em triplicata e em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

A produção de AIA foi classificada em diferentes níveis. De acordo com Montañez et al. (2012), considera-se como baixa produção, bactérias que sintetizam até 50,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , média, entre 50,00 e 150,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e, alta, bactérias que produzem mais que 150,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA. Assim, a classificação foi feita com base nos testes estatísticos aplicados, sendo considerados apenas, os resultados significativos.

#### **2.4. Caracterização de isolados bacterianos produtores da molécula *quorum sensing* (QS)**

Para a caracterização de isolados produtores da molécula ALHs (*N-Acyl Lactona Homoserina*), um tipo de molécula *quorum sensing*, utilizou-se a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, biossensor de ALHs. Esta bactéria possui o promotor TraR (fusão do gene TraG :: LacZ), que forma um complexo, que regula a expressão do operon da LacZ, codificando a enzima  $\beta$  – galactosidase, a qual quebra a molécula X-gal, tornando a célula azul (QUECINE et al., 2012).

Para o teste foram preparados bioensaios, a bactéria *A. tumefaciens* NTL4 foi inoculada linearmente na extremidade de placas de Petri contendo meio LB (*Lúria Bertani*) acrescido de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de X-gal (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Beta-D-Galacto-Pyranoside*) por toda a superfície da placa, os isolados bacterianos foram repicados de forma transversal à *A. tumefaciens* NTL4. A presença de colônias de *A. tumefaciens* com pigmentação azul, 48 horas após a inoculação, indicou a produção de AHLs pelos isolados bacterianos avaliados. O experimento foi conduzido em duplicata.

#### **2.5. Seleção de isolados bacterianos produtores de exopolissacarídeos (EPS)**

Para avaliação qualitativa e produção de EPS, os isolados bacterianos foram cultivados em meio TSA líquido. Após o crescimento bacteriano, foram coletados 10 $\mu\text{L}$  do inóculo e colocados sob discos estéreis de papel filtro de 5 mm de diâmetro. As bactérias foram cultivadas sob esses discos, em meio de cultura modificado, contendo 10% de sacarose – fonte de carbono (20 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 15 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>; 0,015 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>; 0,015 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>; 0,03 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>; 0,015 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 15 g L<sup>-1</sup> de Agar), em pH 7,5, a 28°C, por 48 horas.

Em seguida, a caracterização qualitativa do EPS foi verificada visualmente pela presença ou ausência de halo de produção de EPS, sendo, portanto, caracterizado como

positivas, as linhagens bacterianas que apresentaram halo, e negativas, bactérias que não apresentaram halo, 72 horas após a inoculação. Para confirmar a produção de EPS, foram coletadas, com auxílio de uma alça de platina, células bacterianas que foram colocadas em tubos contendo 2 mL de álcool etílico. A confirmação aconteceu a partir da precipitação do EPS. O teste foi considerado negativo quando o meio ficou turvo (KAVAMURA et al., 2013).

As bactérias positivas foram classificadas de acordo com o tamanho do halo do EPS produzido, correspondendo a + para halo com pouca produção- halo < 10 mm de diâmetro; ++ para halo com média produção - halo  $\geq 10 \leq 14$  mm de diâmetro; +++ para halo com ótima produção- halo > 14 mm de diâmetro. Para a medição do halo foi utilizado um paquímetro digital. O experimento foi realizado em triplicata e o arranjo experimental caracterizado como fatorial duplo.

## **2.6. Estudo da presença de isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Burkholderia* através de PCR específica**

A PCR específica para detectar isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Burkholderia* foi realizada em alguns isolados (Tabela 2) segundo a metodologia proposta por Perin et al. (2006). As reações de PCR foram realizadas com os *primers* GBF (5' - AGTAATACATCGGAACRTGT - 3') e GBN2-R (5' - GCTCTTGCGTAGCAACTAG - 3') em um volume final de 25 $\mu$ L, contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde, 10X tampão da enzima, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM de cada dNTPs, 100 $\mu$ M dos *primers*, 5U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq DNA Polimerase (HOT FIREPol) e água ultrapura. Foi utilizado um controle positivo UAGC740, pertencente à espécie *Burkholderia gladioli*.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems®) programado para realizar uma desnaturação inicial 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 45 seg e extensão do *primer* a 72°C por 1 min, seguida de extensão final a 72°C por 5 min. Após a amplificação, a reação foi avaliada em gel de agarose (1,2% p/v) em tampão TAE 1x (40mM de Tris-acetato; 1mM de EDTA), corado com Blue Green (LGC Bio).

Os perfis de bandas foram observados sob luz ultravioleta e fotodocumentados. Os isolados que apresentaram perfis em torno de 1025 pb foram caracterizados como



positivos para esta PCR específica, sendo, portanto, pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

**Tabela 2.** Isolados bacterianos associados a plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidos ao estudo da PCR específica para o gênero *Burkholderia*.

Isolados Bacterianos	Variedade	Nicho	Isolados Bacterianos	Variedade	Nicho
UAGF04	RB 92579	RIZ	UAGF36	RB 867515	RIZ
UAGF07	RB 92579	RIZ	UAGF37	RB 867515	RIZ
UAGF09	RB 92579	RIZ	UAGF40	RB 867515	RIZ
UAGF10	RB 92579	RIZ	UAGF41	RB 867515	RIZ
UAGF11	RB 92579	RIZ	UAGF42	RB 867515	RIZ
UAGF12	RB 92579	RIZ	UAGF44	RB 867515	RIZ
UAGF13	RB 92579	RIZ	UAGF46	RB 867515	ER
UAGF15	RB 92579	RIZ	UAGF47	RB 867515	ER
UAGF20	RB 92579	ER	UAGF50	RB 867515	ER
UAGF21	RB 92579	ER	UAGF51	RB 867515	ER
UAGF22	RB 92579	ER	UAGF52	RB 867515	ER
UAGF23	RB 92579	ER	UAGF53	RB 867515	ER
UAGF24	RB 92579	ER	UAGF55	RB 867515	ER
UAGF27	RB 92579	ER	UAGF56	RB 867515	ER
UAGF30	RB 92579	ER	UAGF57	RB 867515	ER
UAGF32	RB 867515	RIZ	UAGF58	RB 867515	ER
UAGF33	RB 867515	RIZ	UAGF59	RB 867515	ER

### 2.7. Estudo da diversidade genética de isolados bacterianos associados à cana-de-açúcar através da técnica de BOX – PCR

Inicialmente, foi realizada a repicagem dos isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar em meio sólido TSBA (16 gL<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico; 30 g L<sup>-1</sup> de TSB). Após o cultivo, foi realizada a técnica de BOX-PCR, direto da colônia bacteriana, como fonte de DNA, para avaliar a diversidade genética desses microorganismos. Para tal, as reações de PCR foram preparadas segundo Mendes et al. (2007), utilizando o *primer* BOX – 1AR (5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3') em um volume final de 25µL, contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde, 10µM do *primer*, 25 mM de cada dNTP, 10 mg mL<sup>-1</sup> de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 100% de DMSO (Dimetilsufoxamida), 5x *Gitschier buffer* (1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1M Tris-HCL pH 8,8; 1M

MgCl<sub>2</sub>; 0,5M EDTA pH 8,8; 14,4M β-mercaptoethanol), 5U μL<sup>-1</sup> de Taq Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 3 segundos, 92°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 min e extensão do *primer* a 65°C por 8 min, seguida de extensão final a 65°C por 8 min. Após a amplificação, a reação foi avaliada em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão TAE 1x, corado com Gel Red (Biotium) e 10X Loading Buffer (Invitrogen) e observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

Os perfis de bandas observados foram transformados em uma planilha binária e, em seguida, utilizados para obter um dendrograma de similaridade calculado através do coeficiente de Jaccard e agrupado por meio do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), utilizando o software PAST versão 1.9 (OLIVEIRA, 2012).

## **2.8. Perfil de ácidos graxos de isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar**

Dos 54 isolados bacterianos avaliados, sete foram selecionados para serem estudados quanto ao perfil dos ácidos graxos. As bactérias foram selecionadas a partir da diversidade genética encontrada no dendrograma de similaridade genética, obtido com a técnica de BOX-PCR, e com base nos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, como produção de ácido indol acético, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de exopolissacarídeos.

Inicialmente, os isolados bacterianos (UAGF02, UAGF05, UAGF19, UAGF35, UAGF49, UAGF54 e UAGF60) foram inoculados em meio de cultura sólido - TSBA, por meio da técnica de estrias cruzadas (Figura 1), e incubadas em BOD por 24 horas, a 28°C. Decorrido esse tempo, a biomassa bacteriana do terceiro quadrante foi retirada das placas, com auxílio de uma alça de platina, e transferidos para tubos de vidro com tampa de rosca. Com o auxílio de uma pipeta, foram adicionados aos tubos 1mL do reagente de saponificação (150 gL<sup>-1</sup> de NaOH; 500 ml L<sup>-1</sup> de metanol e 500 ml L<sup>-1</sup> de água deionizada). Em seguida, os tubos foram agitados durante 10 segundos e aquecidos em banho de água fervente, por aproximadamente 5 minutos e colocados para esfriar em banho de água à temperatura ambiente. Após o resfriamento, os tubos foram

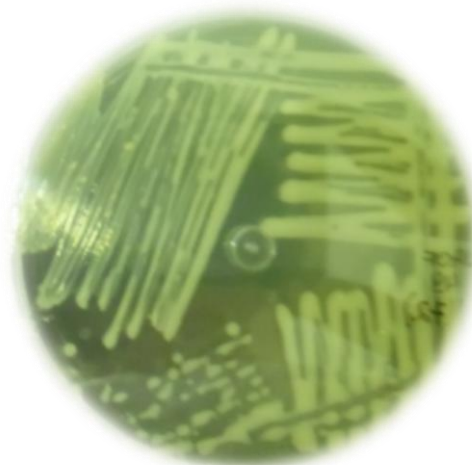
agitados novamente por 10 segundos e retornaram ao banho de água quente, no qual permaneceram por 25 minutos, sendo mais uma vez, resfriados em água à temperatura ambiente.

Decorrida a saponificação, foram adicionados aos tubos 2 mL do reagente de metilação (460 ml L<sup>-1</sup> de metanol e 545 ml L<sup>-1</sup> de HCL), os quais foram agitados por 5 segundos e aquecidos a 80°C por 10 minutos e colocados para resfriarem em banho de água fria.

Após a metilação, foram adicionados aos tubos 1,25 mL do reagente de extração (500 ml L<sup>-1</sup> de Hexano e 500 ml L<sup>-1</sup> MTBE - *Methyl Tert - Butyl Ether*), os quais foram agitados em um rotator clínico por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram destampados e a fase aquosa foi descartada com auxílio de pipetas de Pasteur de vidro e haste longa.

Para realizar a lavagem básica, foram adicionados 3 mL do reagente de lavagem (12g L<sup>-1</sup> de NaOH e água deionizada) à fase orgânica que permaneceu nos tubos após a extração. Os tubos foram novamente agitados em um rotator clínico por 5 minutos e centrifugados por 3 minutos a 3000 rpm. Em seguida, cerca de 2/3 da fase orgânica foram pipetados e repassados para um vial (tubos de vidro) apropriados para análise cromatográfica. A análise de ácidos graxos foi realizada por meio do cromatógrafo gasoso (Agilent GC System Serie 6850).

Os ácidos graxos foram analisados por um programa de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock® TSBA versão 6.0, Microbial ID, Newark, DE, USA). Os perfis de ácidos graxos obtidos foram comparados com os dados contidos na biblioteca TSBA 6 versão 6.0. O índice de similaridade (IS)  $\geq$  a 0,5 e separados no mínimo de 0,1 entre a primeira e a segunda identificação, foram considerados para classificar os isolados a um nível específico (KAVAMURA, 2012).



**Figura 1.** Inoculação de bactérias em meio sólido TSBA, por meio da técnica estrias cruzadas, para análise do perfil de ácidos graxos.

## 2.9. Sequenciamento genético

Os setes isolados avaliados quanto ao perfil de ácidos graxos, também foram submetidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA

### 2.9.1. Extração e Quantificação de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando PureLink<sup>®</sup> Genomic DNA Kits (Invitrogen), segundo orientações do fabricante. Em seguida, o DNA genômico foi analisado em gel de agarose (1,0% p/v) em tampão TAE 1x, corado com Gel Red (Biotium<sup>®</sup>) e 10X Loading Buffer (Invitrogen<sup>®</sup>) e observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

A quantificação do DNA genômico extraído foi realizada utilizando-se o NanoDrop 2000<sup>®</sup>. Para tal, foi utilizado para amostra do branco 1 $\mu$ L de água ultrapura (MiliQ), e 1 $\mu$ L do DNA genômico extraído das amostras.

### 2.9.2. PCR do gene 16S rRNA

A amplificação do 16S rDNA foi realizada utilizando os *primers* 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3'). A reação de PCR foi realizada para um volume final de 25  $\mu$ L, contendo água ultrapura, 10X tampão da enzima, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M dos *primers*, 100% de DMSO (dimetilsulfoxamida), 25 mM de cada dNTP, 5U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq Polimerase

(Invitrogen) e 10-20 ng de DNA genômico. As reações foram colocadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C a 1 min, 55°C a 1 min e 72°C a 2 min, seguido de extensão final de 72°C a 10 min. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose (2% p/v) em tampão TAE 1x corado com Gel Red (Biotium) e 10X Loading Buffer (Invitrogen) e observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

### 2.9.3. Purificação dos Produtos de PCR do gene 16s rRNA

Após visualização dos produtos do PCR do gene 16S rRNA, foi realizada a purificação. Para isso, foram coletados 20 µL da reação de PCR. Em seguida, foi adicionado 1 mL de isopropanol gelado às amostras e centrifugado a 13000 g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 125 µL de etanol 80% gelado e centrifugado a 13000 g por 5 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e as amostras foram colocadas para secar a 55°C por 2 horas. Por fim, foram adicionados 20 µL de água ultrapura e as amostras foram mantidas a -20°C. O DNA genômico purificado foi visualizado em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão TAE 1x corado com Gel Red (Biotium) e 10X Loading Buffer (Invitrogen) e observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

### 2.9.4. Reação de Sequenciamento e Precipitação

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação para o sequenciamento. Para a reação de sequenciamento foram utilizados dois *primers*: 27F (5'- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5' - TACGGYTACCTTGTTACGACT -3') em reações independentes para um volume final de 20 µL. A cada reação independente foram adicionados 3,5 µl de tampão Save Money (Applied Biosystems), 1,0 µL de BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems), 0,8 µL de DMSO (dimetilsulfoxamida), 0,08 µL do *primer*, 1 µL dos produtos de PCR purificados e água ultrapura. As reações foram colocadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 96°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C a 15 segundos, 55°C a 15 segundos e 60°C a 4 segundos.

Em seguida, as amostras foram precipitadas com 2 µL de EDTA (125mM), 2 µL de acetato de sódio (3M) e 50 µL de Etanol 100%. As amostras foram misturadas por

inversão 4X e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Foi feita uma centrifugação a 3000 g por 30 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi adicionado às amostras 70 µL de Etanol 70%, as quais foram centrifugadas a 1650 g, por 15 minutos a 4°C. As amostras foram colocadas para secar e armazenadas a -20°C. Passada essa etapa, as amostras foram injetadas no sequenciador (ABI 3500 Genetic Analyzer – Applied Biosystems), localizado no LMA (Laboratório de Microbiologia Ambiental – Embrapa Meio Ambiente), para que as análises parciais do gene 16S rRNA fossem realizadas.

Com os dados do eletroferograma, a qualidade das sequências foi conferida utilizando o software FinchTV, versão 1.4.0 (Geospiza Inc) e as sequências de cada oligonucleotídeo iniciador foram unidas utilizando o software BioEdit, versão 7.1.3.0. Por fim, as sequências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), disponível no website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

## **2.10. Testes de germinação em sementes inoculadas com BPCV**

Para os testes de inoculação, foram selecionados 25 isolados bacterianos, com base nos dados de promoção de crescimento vegetal obtidos nesta pesquisa. Assim, a inoculação foi realizada em sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. Ipa 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José), ambas fornecidas pelo Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA.

Os inoculos bacterianos foram obtidos a partir de colônias bacterianas isoladas, que foram repicadas em meio TSA líquido. Após o crescimento bacteriano, as culturas foram diluídas em solução tampão PBS (8 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,2 g L<sup>-1</sup> de KCl; 1,44 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) e a densidade ótica dos isolados foi verificada em espectrofotômetro (630 nm), de forma a atingir densidade óptica aproximada de 0,095 (LIMA, 2012). As sementes permaneceram imersas nessa solução por 30 minutos sob agitação. Passado esse tempo, em experimentos independentes, as sementes inoculadas foram semeadas em papel tipo Germitest, umedecidos 2,5 vezes o seu peso com água destilada na forma de rolo e depois mantida em germinador, a temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias (OLIVEIRA, 2012). Os tratamentos foram dispostos em

delineamento inteiramente casualizado, com 26 tratamentos, 3 repetições e amostragem de 25 sementes por cada repetição, totalizando 1950 unidades experimentais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Identificação dos tratamentos da inoculação bacteriana em sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. Ipa 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José).

Tratamento	Isolado Bacteriano	Tratamento	Isolado Bacteriano	Tratamento	Isolado Bacteriano
1	Controle*	10	UAGF25	19	UAGF 44
2	UAGF01	11	UAGF26	20	UAGF 46
3	UAGF05	12	UAGF02	21	UAGF 48
4	UAGF06	13	UAGF19	22	UAGF 49
5	UAGF12	14	UAGF28	23	UAGF 53
6	UAGF14	15	UAGF29	24	UAGF 54
7	UAGF16	16	UAGF31	25	UAGF 55
8	UAGF17	17	UAGF35	26	UAGF 60
9	UAGF18	18	UAGF39		

\*Controle= ausência de isolado bacteriano

Para avaliação da promoção do crescimento vegetal nas sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. Ipa 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José) inoculadas com diferentes isolados bacterianos, foram avaliadas as seguintes variáveis, de acordo com a regra de análise de sementes – RAS (MAPA, 2009): primeira contagem de germinação (correspondente a primeira contagem de sementes germinadas após a semeadura), o índice de velocidade de germinação (IVG) proposto por Maguire (1962); comprimento total (cm), comprimento da parte aérea e radícula (cm); fitomassa total fresca e seca (g).

### 2.11. Análise estatística

Os resultados da quantificação do ácido indol acético (AIA), produção de exopolissacarídeos (EPS) e das análises dos testes de germinação em sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. Ipa 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José) foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5%, através do software Sisvar, versão 5.3.

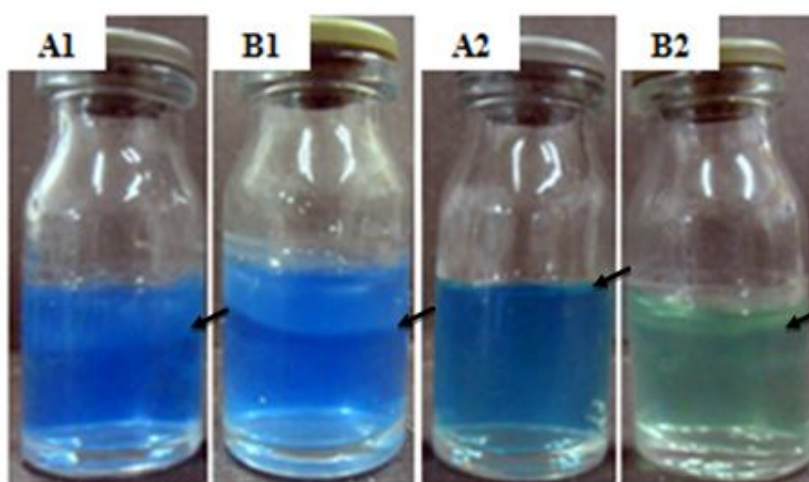
Os dados de frequência relativa foram submetidos ao teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para confirmar a influência dos fatores, sobre a distribuição dos isolados, fixadores de nitrogênio, produtores de QS e EPS.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

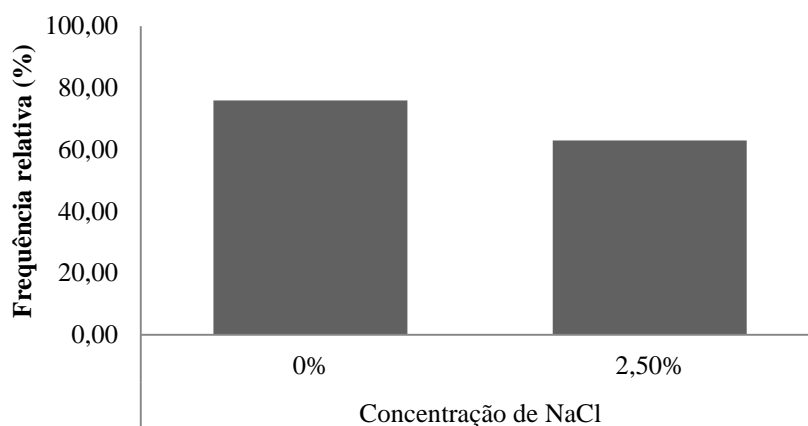
#### 3.1. Fixação biológica de nitrogênio por isolados bacterianos

Os isolados bacterianos, associados à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), apresentaram comportamento diferente em relação a fixação biológica de nitrogênio, sob as condições de estresse aplicada. Contudo, todos os isolados avaliados foram positivos aos 11 dias de cultivo, em ambas as concentrações de NaCl (Figura 2).



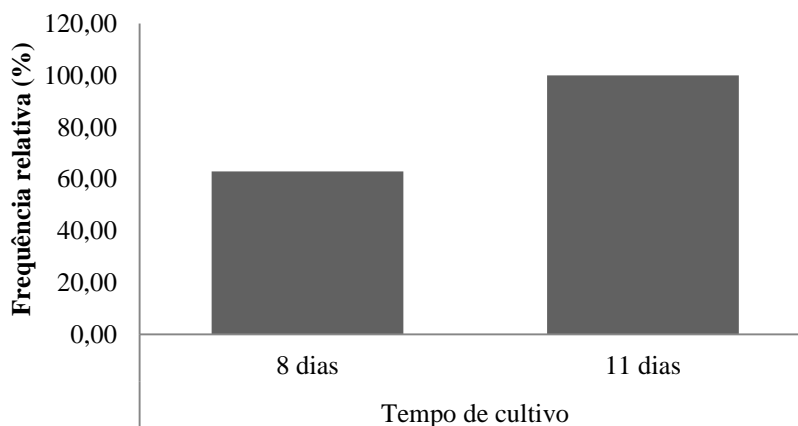
**Figura 2.** Teste positivo de fixação biológica de nitrogênio – FBN, por isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) sob diferentes concentrações de NaCl. A1 = ausência de NaCl (0%) aos 8 dias de cultivo; B1 = presença de NaCl (2,5%) aos 8 dias de cultivo; A2 = ausência de NaCl (0%) aos 11 dias de cultivo; B2 = presença de NaCl (2,5%) aos 11 dias de cultivo.

Considerando a distribuição dos isolados bacterianos positivos para a FBN, verifica-se influência das concentrações de 0% e 2,5% de NaCl sob esta característica. De acordo com o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), a frequência de isolados diazotróficos foi maior na ausência de NaCl (75,93%), enquanto que na presença de 2,5% NaCl apenas 62,96% foram positivos ao teste (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição dos isolados bacterianos fixadores de nitrogênio em relação à ausência (0%) e presença (2,5%) de NaCl no meio de cultura. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou haver influência dos tratamentos entre nichos ( $P < 0,05$ ).

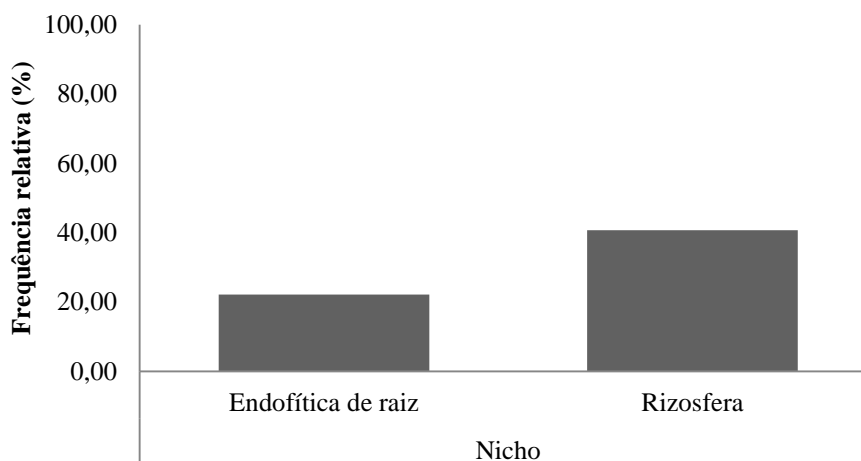
Ainda nesse contexto, com o teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ), revelou que o tempo também teve influência sobre a FBN. Aos 8 dias de cultivo, apenas 62,96% dos isolados fixaram nitrogênio atmosférico, independente da ausência e/ou presença de NaCl, sendo que aos 11 dias, todos os isolados foram positivos ao teste (100,00%) – Figura 4.



**Figura 4.** Distribuição dos isolados bacterianos fixadores de nitrogênio em relação ao tempo de cultivo (8 e 11 dias). O teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) a revelou haver diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

O teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) revelou, ainda, diferença entre os nichos os quais os isolados pertencem. O nicho da rizosfera obteve maior frequência de isolados

diazotróficos (40,74%) quando comparado ao nicho endofítico de raiz (22,22%) - Figura 5.



**Figura 5.** Distribuição dos isolados bacterianos fixadores de nitrogênio em relação ao nicho de colonização. O teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) a revelou haver diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

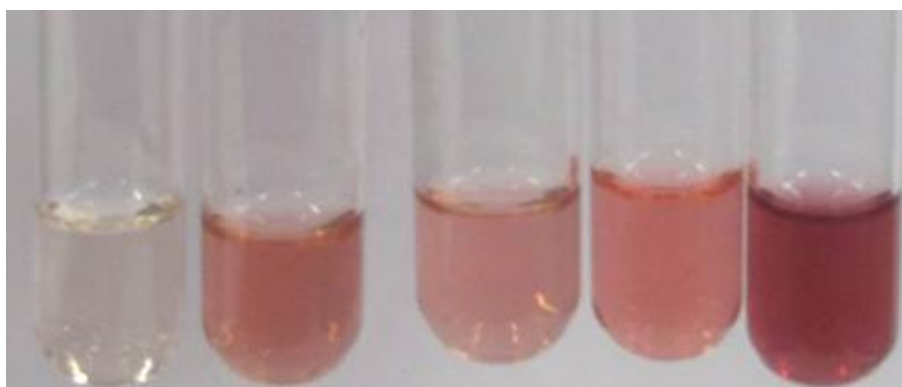
Esses resultados demonstram que a metodologia utilizada é útil para avaliar a FBN, pois torna possível diferenciar a expressão das bactérias sobre a presença e/ou ausência de diferentes fatores abióticos (ARAÚJO et al., 2010).

Os resultados obtidos, são diferentes dos encontrados por Leite et al. (2014), que ao testarem isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar, quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio sob a presença de estresse salino, verificaram que apenas 72,5% dos isolados foram positivos ao teste, em ambas as condições. Santos et al. (2012), também ao avaliarem o efeito de diferentes concentrações de NaCl, sobre a FBN, por bactérias associadas a cana-de-açúcar, constataram que na ausência de NaCl, todos os isolados bacterianos cresceram sob essa condição, ou seja, fixaram  $N_2$ ; contudo, na presença de 2,5% de NaCl, apenas 60% das bactérias foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Pereira et al. (2012) salientam que o tempo de cultivo, pode influenciar os mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias, sob condições adversas, bactérias que possuem crescimento rápido possuem maior tolerância a elevadas concentrações de NaCl em meio de cultura, devido à maior produção de polissacarídeos que recobrem as células bacterianas, reduzindo, dessa

forma, a superfície de contato entre a célula e o meio que contem sal, tornando as bactérias mais resistentes a essas condições de estresse.

### 3.2. Isolados bacterianos produtores de ácido indol acético (AIA)

Quanto à produção de AIA sob a presença de L-Triptofano, 100% das bactérias avaliadas foram positivas ao teste, ou seja, apresentaram coloração rósea (Figura 6).



**Figura 6.** Produção de ácido indol acético (AIA) por isolados bacterianos associados a plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Diferentes níveis de coloração rosa, caracterizando o teste como positivo.

Os resultados quantitativos apresentaram um amplo intervalo, variando de 0,93  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (UAGF37 - Rizosfera) a 178,02  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (UAGF49 – Endofítico de raiz). É interessante ressaltar que as bactérias UAGF49 (Endofítica de raiz) e UAGF35 (Rizosfera), associadas à variedade RB 867515, foram estatisticamente superiores aos demais isolados bacterianos, com produção de 178,02 e 119,84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Produção de ácido indol acético (AIA) sob a presença de L-triptofano, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por isolados bacterianos associados a variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.).

Isolado bacteriano	Variedade	Nicho	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*	Isolado bacteriano	Variedade	Nicho	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*
UAGF01	RB 92579	RIZ	11,46 f	UAGF30	RB 92579	ER	6,49 f
UAGF02	RB 92579	RIZ	48,07 e	UAGF31	RB 867515	RIZ	6,49 f
UAGF04	RB 92579	RIZ	49,24 e	UAGF32	RB 867515	RIZ	1,58 f
UAGF05	RB 92579	RIZ	15,21 f	UAGF33	RB 867515	RIZ	1,75 f
UAGF06	RB 92579	RIZ	7,06 f	<b>UAGF35</b>	<b>RB 867515</b>	<b>RIZ</b>	<b>119,84 b</b>
UAGF07	RB 92579	RIZ	5,33 f	UAGF36	RB 867515	RIZ	4,86 f
UAGF09	RB 92579	RIZ	25,99 e	UAGF37	RB 867515	RIZ	0,93 f
UAGF10	RB 92579	RIZ	1,32 f	UAGF39	RB 867515	RIZ	29,18 e
UAGF11	RB 92579	RIZ	2,92 f	UAGF40	RB 867515	RIZ	1,58 f
UAGF12	RB 92579	RIZ	9,64 f	UAGF41	RB 867515	RIZ	2,44 f
UAGF13	RB 92579	RIZ	21,85 f	UAGF42	RB 867515	RIZ	15,12 f
UAGF14	RB 92579	RIZ	30,17 e	UAGF44	RB 867515	RIZ	1,06 f
UAGF15	RB 92579	RIZ	1,79 f	UAGF46	RB 867515	ER	94,13 c
UAGF16	RB 92579	ER	40,52 e	UAGF47	RB 867515	ER	6,54 f
UAGF17	RB 92579	ER	50,27 e	UAGF48	RB 867515	ER	74,25 d
UAGF18	RB 92579	ER	72,91 d	<b>UAGF49</b>	<b>RB 867515</b>	<b>ER</b>	<b>178,02 a</b>
UAGF19	RB 92579	ER	95,47 c	UAGF50	RB 867515	ER	35,74 e
UAGF20	RB 92579	ER	48,80 e	UAGF51	RB 867515	ER	36,38 e
UAGF21	RB 92579	ER	37,51 e	UAGF52	RB 867515	ER	47,86 e
UAGF22	RB 92579	ER	49,97 e	UAGF53	RB 867515	ER	22,54 f
UAGF23	RB 92579	ER	24,39 e	UAGF54	RB 867515	ER	39,49 e
UAGF24	RB 92579	ER	35,82 e	UAGF55	RB 867515	ER	89,26 c
UAGF25	RB 92579	ER	61,27 d	UAGF56	RB 867515	ER	11,63 f
UAGF26	RB 92579	ER	68,26 d	UAGF57	RB 867515	ER	31,64 e
UAGF27	RB 92579	ER	25,39 e	UAGF58	RB 867515	ER	43,16 e
UAGF28	RB 92579	ER	32,93 e	UAGF59	RB 867515	ER	53,03 e
UAGF29	RB 92579	ER	37,33 e	UAGF60	RB 867515	ER	37,25 e

**CV (%) = 41.05**

\*Médias seguidas de letras iguais minúsculas na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

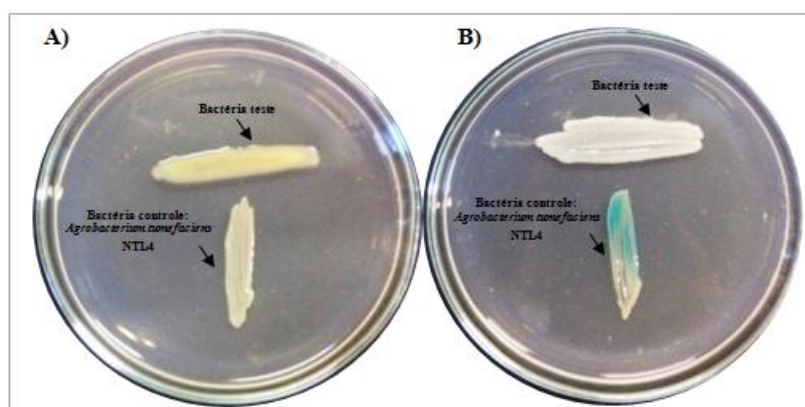
De acordo com a classificação da produção de AIA, observa-se que o nicho endofítico de raiz apresentou 18,52% dos isolados bacterianos, com alta e média produção, percentual superior, ao observado com os isolados da rizosfera, que obteve

apenas 1,85%. Em ambos os nichos, é observado elevado percentual de isolados bacterianos com baixa produção de AIA.

Diversos autores alcançaram resultados promissores em relação à síntese de AIA por bactérias promotoras de crescimento vegetal, tais como Ramos (2011) que ao avaliar a produção de AIA via dependente de L-triptofano, por isolados bacterianos associados a plantas de cana-de-açúcar, verificou que 100% das linhagens bacterianas avaliadas apresentaram capacidade de produzir AIA, chegando a alcançar síntese de  $190\mu\text{g mL}^{-1}$ . Silva et al. (2013) também verificaram que a produção de AIA variou de 0,39 a  $195,00\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , por bactérias isoladas de braquiária (*Brachiaria humidicula* e *Brachiaria decumbens*).

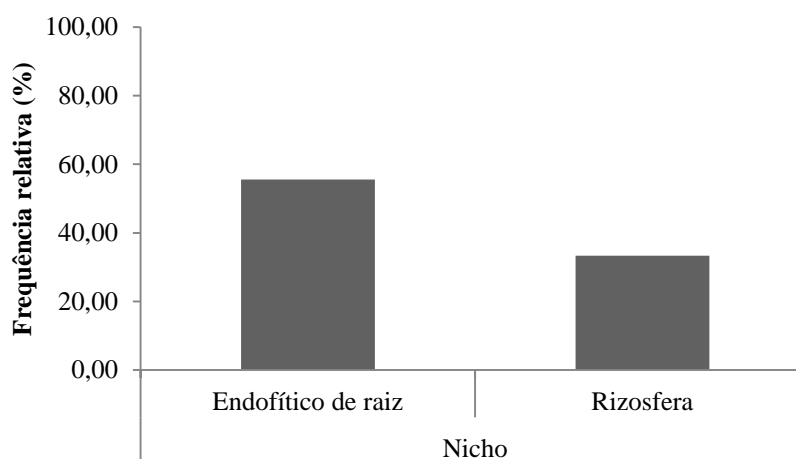
### 3.3. Isolados bacterianos produtores da molécula *quorum sensing* (QS)

A produção de ALH (*N-Acyl Lactona Homoserina*) foi constatada em 87,04% dos isolados bacterianos associados à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Os isolados UAGF02, UAGF04, UAGF09, UAGF10, UAGF11(Rizosfera) e UAGF17 (Endofítico de raiz), associados à variedade RB92579 e UAGF60 (Endofítico de raiz), associado à variedade RB867515, foram negativos ao teste (Figura 7).



**Figura 7.** Caracterização da produção da molécula *Quorum sensing* visualizada através da mudança de coloração da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, inoculada de maneira vertical. Onde (A) caracteriza o teste como negativo – ausência de coloração azulada da *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 e, (B) caracteriza o teste como positivo – presença de coloração azulada da *Agrobacterium tumefaciens* NTL4.

O teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) revelou diferença significativa entre os nichos os quais os isolados pertencem. O nicho endofítico de raiz se sobressaiu em relação à distribuição de isolados bacterianos produtores de QS, com 55,56%, em relação ao nicho da rizosfera (Figura 8).

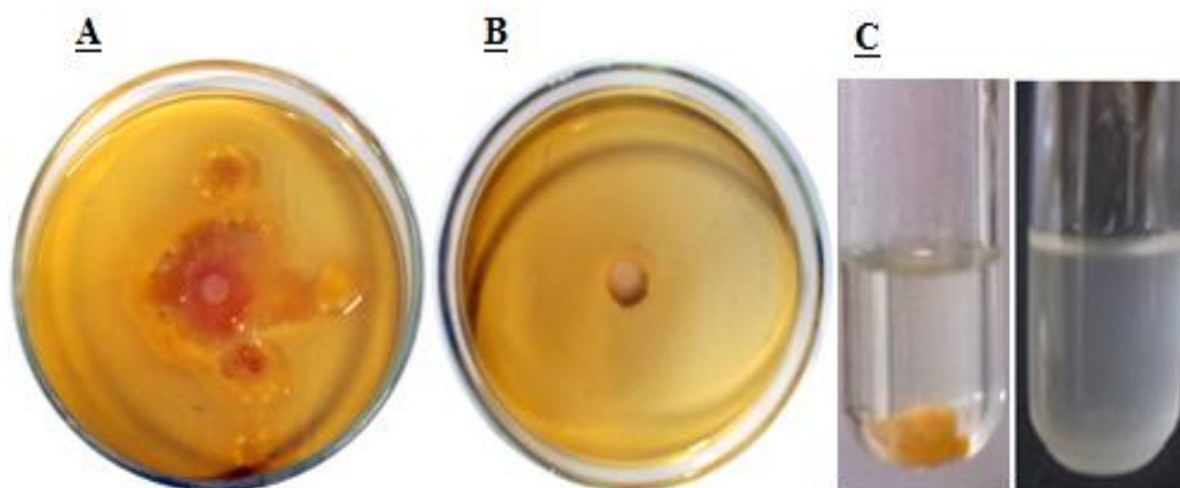


**Figura 8.** Distribuição dos isolados bacterianos produtores da molécula *quorum sensing* (QS) em relação ao nicho de colonização. O teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) revelou haver diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Esses resultados foram superiores aos encontrados por Leite et al. (2014), que estudando bactérias halotolerantes associadas à cana-de-açúcar quanto a produção de *quorum sensing*, observaram que de 102 isolados bacterianos testados, apenas 49% foram positivos para este teste. Já Silva (2014) ao avaliar bactérias halotolerantes, isoladas de plantas de *Atriplex*, verificou que 96,66% dos isolados avaliados foram positivos para esta característica. Bhattacharyya et al. (2008) salientam que as condições ambientais mudam rapidamente, fazendo com que as bactérias acionem mecanismos rápidos de respostas a essas mudanças, para que sua sobrevivência seja possível. Essas respostas incluem a adaptação, a disponibilidade de nutrientes e a defesa contra outros microorganismos. A comunicação *quorum sensing* surge, portanto, como auxílio para que as bactérias consigam coordenar seu comportamento sob diferentes condições ambientais.

### 3.4. Isolados bacterianos produtores de exopolissacarídeos (EPS)

A metodologia utilizada foi eficaz na caracterização da capacidade de isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) em produzirem EPS *in vitro* (Figura 9).



**Figura 9.** Bactéria positiva (B); Bactéria negativa (A); Confirmação da produção de EPS - negativo: turvo/ tubo da direita; positivo: precipitado/tubo da esquerda (C).

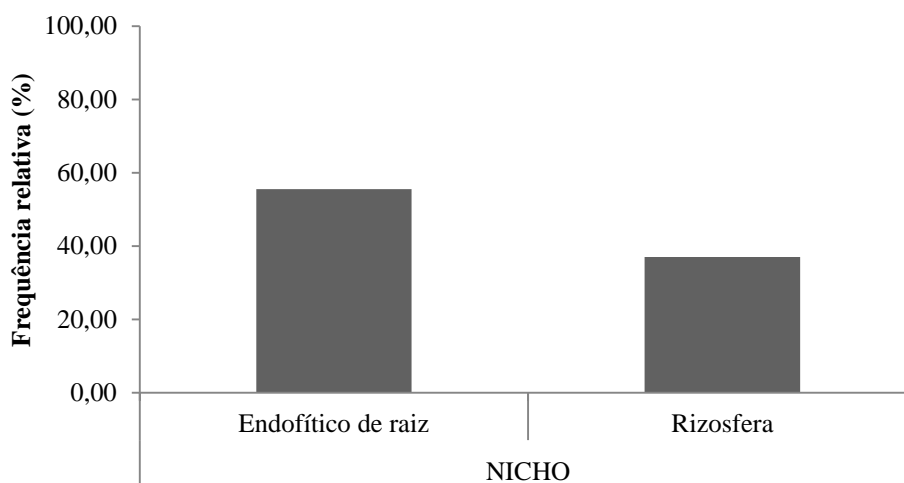
De acordo com a classificação do tamanho do halo de EPS observa-se que, 24 horas após a inoculação, 7,40% dos isolados foram negativos ao teste; 20,37% obtiveram pouca produção; 72,22% média produção e nenhum isolado alcançou alta produção de EPS. Já com o aumento do tempo de cultivo (72 horas), observa-se que nenhum isolado foi negativo ao teste; apenas 3,70% dos isolados tiveram pouca produção; 35,18% média produção e 61,11% alcançaram alta produção de EPS (Tabela 5).



**Tabela 5.** Frequência relativa (%) da produção do halo de EPS, 24 E 72 horas após a inoculação, de acordo com a classificação do tamanho do halo (mm) por isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)

<b>Classificação do tamanho do halo de EPS</b>	<b>Tempo de cultivo</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>	<b>Linhagens bacterianas</b>
<b>Negativo</b>	24 horas	7,40	UAGF01, UAGF02, UAGF11 e UAGF32
	72 horas	0,00	-
<b>Pouca (&lt;10 mm de diâmetro)</b>	24 horas	20,37	UAGF05, UAGF06, UAGF07, UAGF10, UAGF27, UAGF33, UAGF40, UAGF41, UAGF44, UAGF47 e UAGF48
	72 horas	3,70	UAGF02 e UAGF11
<b>Média (<math>\geq 10 \leq 14</math> mm de diâmetro)</b>	24 horas	72,22	UAGF04, UAGF09, UAGF12, UAGF13, UAGF14, UAGF15, UAGF16, UAGF17, UAGF18, UAGF19, UAGF20, UAGF21, UAGF22, UAGF23, UAGF24, UAGF25, UAGF26, UAGF28, UAGF29, UAGF30, UAGF31, UAGF35, UAGF36, UAGF37, UAGF39, UAGF42, UAGF46, UAGF49, UAGF50, UAGF51, UAGF52, UAGF53, UAGF54, UAGF55, UAGF56, UAGF57, UAGF58, UAGF59 e UAGF60
	72 horas	35,18	UAGF01, UAGF05, UAGF06, UAGF10, UAGF12, UAGF14, UAGF25, UAGF26, UAGF27, UAGF28, UAGF29, UAGF31, UAGF32, UAGF33, UAGF47, UAGF48, UAGF51, UAGF52 e UAGF54
	24 horas	0,00	-
<b>Alta (&gt;14 mm de diâmetro)</b>	72 horas	61,11	UAGF04, UAGF07, UAGF09, UAGF13, UAGF14, UAGF15, UAGF16, UAGF17, UAGF18, UAGF19, UAGF20, UAGF21, UAGF22, UAGF23, UAGF24, UAGF30, UAGF35, UAGF36, UAGF37, UAGF39, UAGF40, UAGF41, UAGF42, UAGF44, UAGF46, UAGF49, UAGF50, UAGF53, UAGF55, UAGF56, UAGF57, UAGF58, UAGF59 e UAGF60

Ainda nesse contexto, o teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) revelou diferença significativa entre os nichos os quais os isolados pertencem. Na figura 10, observa-se que, mais uma vez, o nicho endofítico de raiz se sobressaiu quando comparado ao nicho da rizosfera, com distribuição de bactérias produtoras de EPS de 55,56% e 37,04%, respectivamente.



**Figura 10.** Distribuição dos isolados bacterianos produtores de EPS em relação ao nicho de colonização. O teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) a revelou haver diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Os resultados obtidos, para a produção de EPS foram superiores ao encontrados por Kavamura et al. (2013) , que ao isolar bactérias da região semiárida do Brasil, verificou que apenas 65% dos isolados testados, foram positivos ao teste. Ahemad & Khan (2012) ao testar bactérias da espécie *Mesorhizobium* sp. quanto à produção de EPS, sob a presença e ausência de diferentes pesticidas, verificaram que todas as linhagens produziram essa substância, entretanto, a maior produção foi verificada sob a presença de estresse, havendo um incremento de 38% na síntese de EPS.

Ao estudar a produção de EPS, 24 horas após a inoculação, foi observado que os isolados pertencentes ao nicho da rizosfera UAGF01, UAGF02 e UAGF32 foram negativos, sendo o isolado UAGF41 o que obteve menor produção. Três dias (72 horas) após a inoculação, observa-se um aumento na produção de EPS pelos isolados bacterianos, sendo as bactérias UAGF11, UAGF01 e UAGF02, pertencentes ao nicho da rizosfera, inferiores estatisticamente aos demais (Tabela 6).

Considerando-se a influência do tempo sobre a produção de EPS, foi observado que o aumento no tempo de cultivo (72 horas) beneficiou a maioria dos isolados quanto à produção de EPS, como os isolados UAGF04, UAGF15, UAGF16, UAGF17, UAGF19, UAGF20, UAGF21, UAGF22, UAGF23, UAGF24, UAGF57, UAGF58, UAGF59 e UAGF60. Ainda nesse contexto, verificou-se que os isolados UAGF01, UAGF02, UAGF11 e UAGF32, em 24 horas de cultivo, foram negativos quanto à

síntese de EPS, mas com o passar do tempo (72 horas de cultivo) esses isolados apresentaram halo de produção, sendo, portanto, positivos ao teste (Tabela 6).

**Tabela 6.** Halo de produção de exopolissacarídeos (EPS), nos tempos de 24 e 72 horas de cultivo por isolados bacterianos associados à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.).

Isolado bacteriano	Produção de EPS (mm)*		Isolado bacteriano	Produção de EPS (mm)*	
	24 horas	72 horas		24 horas	72 horas
UAGF01	0,00 Cb	10,10 Da	UAGF30	12,06 Ab	15,94 Ba
UAGF02	0,00 Cb	9,28 Da	UAGF31	11,08 Aa	13,38 Ca
UAGF04	11,47 Ab	18,26 Aa	UAGF32	0,00 Cb	10,55 Da
UAGF05	9,36 Ab	13,70 Ca	UAGF33	9,69 Ab	12,94 Ca
UAGF06	8,66 Ab	12,46 Ca	UAGF35	10,37 Ab	14,33 Ca
UAGF07	9,68 Ab	14,73 Ca	UAGF36	11,11 Ab	14,27 Ca
UAGF09	11,21 Ab	15,26 Ba	UAGF37	10,63 Ab	14,29 Ca
UAGF10	8,98 Ab	11,73 Ca	UAGF39	11,33 Ab	14,10 Ca
UAGF11	0,00 Cb	7,16 Ea	UAGF40	9,53 Ab	15,02 Ba
UAGF12	10,72 Ab	13,29 Ca	UAGF41	3,96 Bb	14,18 Ca
UAGF13	10,99 Ab	15,11 Ba	UAGF42	10,98 Ab	15,16 Ba
UAGF14	10,38 Aa	12,66 Ca	UAGF44	9,92 Ab	15,81 Ba
UAGF15	10,74 Ab	16,87 Aa	UAGF46	11,49 Ab	15,26 Ba
UAGF16	12,30 Ab	18,27 Aa	UAGF47	9,91 Ab	12,47 Ca
UAGF17	12,63 Ab	18,31 Aa	UAGF48	9,49 Ab	11,94 Ca
UAGF18	11,68 Ab	16,55 Ba	UAGF49	11,06 Ab	14,18 Ca
UAGF19	12,14 Ab	17,42 Aa	UAGF50	10,85 Ab	14,30 Ca
UAGF20	11,34 Ab	17,19 Aa	UAGF51	10,13 Ab	13,77 Ca
UAGF21	11,31 Ab	18,18 Aa	UAGF52	11,01 Ab	14,00 Ca
UAGF22	12,49 Ab	17,73 Aa	UAGF53	11,13 Ab	15,01 Ba
UAGF23	12,67 Ab	19,54 Aa	UAGF54	10,44 Ab	13,84 Ca
UAGF24	11,12 Ab	17,67 Aa	UAGF55	10,90 Ab	15,43 Ba
UAGF25	12,50 Aa	13,54 Ca	UAGF56	11,23 Ab	14,55 Ca
UAGF26	10,51 Ab	13,10 Ca	UAGF57	10,96 Ab	16,80 Aa
UAGF27	9,54 Ab	12,17 Ca	UAGF58	11,77 Ab	17,75 Aa
UAGF28	11,63 Aa	13,75 Ca	UAGF59	11,54 Ab	18,05 Aa
UAGF29	10,67 Aa	12,61 Ca	UAGF60	10,87 Ab	16,88 Aa

**CV (%) = 11,45**

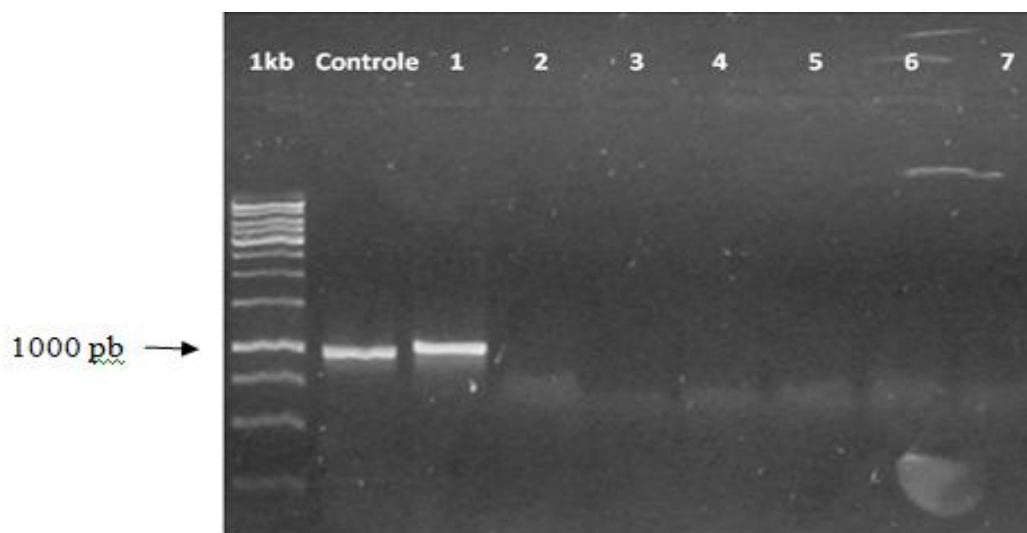
\*Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Esses dados demonstram que apesar de não ter sido aplicado nenhum estresse para se verificar a produção de EPS, a maioria das bactérias avaliadas foram positivas,

sugerindo que a aplicação de qualquer estresse biótico e/ou abiótico, forçaria as bactérias a sintetizarem maiores quantidades de EPS, visto que essa substância é produzida em maior quantidade sobre a presença de condições desfavoráveis, pois o EPS protege a planta e as comunidades microbianas contra os efeitos dessas condições adversas (QURASHI et al., 2012).

### 3.5. Detecção de isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Burkholderia*

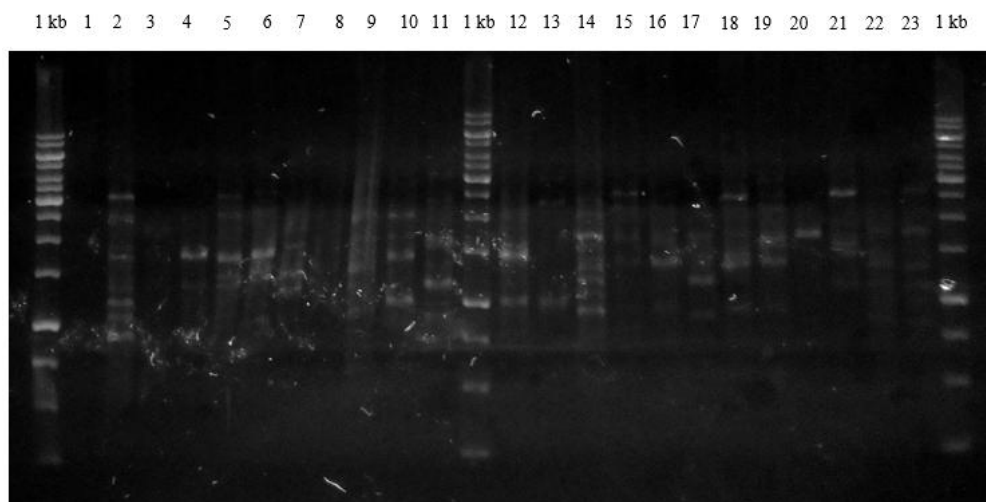
A PCR específica para detectar isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Burkholderia* revelou bandas em torno de 1000 pb – Figura 11. Foi observado que dos isolados avaliados, apenas UAGF 01 e UAGF 09, pertencentes à rizosfera e associados à variedade RB 92579, apresentaram a amplificação da banda, sendo, portanto, pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Perin et al. (2006) ao utilizar esta mesma técnica de biologia molecular, verificaram também que ela foi útil para detectar isolados bacterianos associados à plantas de cana-de-açúcar e milho, sendo que do total de 900 bactérias analisadas, 111 pertenciam ao gênero *Burkholderia*.



**Figura 11.** PCR específica para detecção de isolados bacterianos pertencente ao gênero *Burkholderia*. 1kb = marcador molecular; Controle = Linhagem bacteriana *Burkholderia* - UAGC 740; 1 – 7 = isolados bacterianos avaliados.

### 3.6. Análise da diversidade genética pela técnica de BOX – PCR

A análise da diversidade genética por meio da técnica de BOX-PCR permitiu obter vários perfis de bandas (Figura 12).

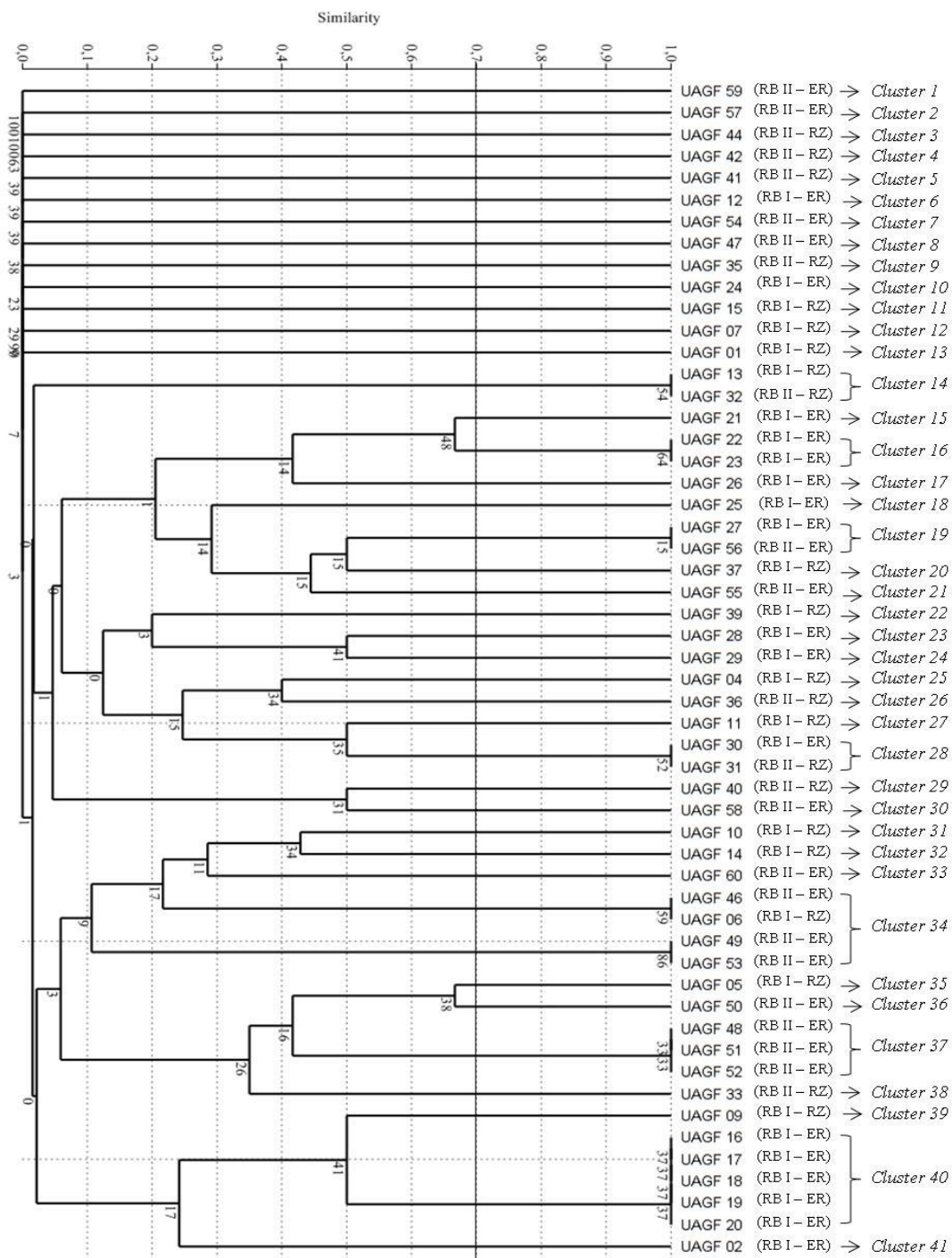


**Figura 12.** Perfis genômicos gerados pela amplificação do *primer* BOX 1AR de parte dos isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), avaliados em gel de agarose a 1,5%. 1kb: marcador molecular; 1 a 23: isolados bacterianos.

O coeficiente de *Jaccard* evidenciou a presença de 41 grupos (*clusters*), com alta variabilidade genética entre os isolados bacterianos avaliados (Figura 13). A 70% de similaridade, 66,66% dos isolados apresentaram elevada diversidade genética, enquanto que 33,33% foram altamente similares geneticamente entre si. Esses resultados corroboram aos encontrados por Oliveira (2012), que ao verificar a similaridade genética de bactérias associadas a plantas de braquiária, verificou alta variabilidade entre os isolados, sendo que 21,2% das bactérias foram 100% similares entre si. Rocha et al. (2010) também encontraram elevada diversidade genética entre isolados bacterianos associados à plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) por meio da técnica de BOX-PCR.

Considerando os isolados bacterianos que apresentaram alta similaridade genética entre si (100%), foi observado que alguns isolados, apesar de serem similares geneticamente, foram isolados de variedades diferentes de cana-de-açúcar, como os isolados UAGF13 e UAGF32, associados a RB92579 e RB867515, respectivamente. Outros pertencem a nichos e variedade diferentes, como UAGF30 (Endofítico de raiz – RB92579), UAGF31 (Rizosfera – RB867515), UAGF46 (Endofítico de raiz –

RB867515) e UAGF06 (Rizosfera – RB92579). (Figura 13). Uma vez que a técnica de BOX-PCR é considerada como um *fingerprint* bacteriano, esses resultados corroboram a teoria de que as bactérias podem flutuar entre os nichos de colonização, quando associadas às plantas, e entre genótipos vegetais (BOGAS, 2010).



**Figura 13.** Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da

matriz de similaridade genética de 54 isolados bacterianos, associados à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). O coeficiente de *Jaccard* foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. O *bootstrap* foi de 1000 vezes e os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. RB I = Variedade RB92579; RB II = Variedade RB867515; RZ = Rizosfera; ER = Endofítica de raiz.

### 3.7. Análise do perfil de ácidos graxos e identificação de isolados bacterianos

O estudo do perfil de ácidos graxos e a identificação genética a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, das bactérias associadas a cana-de-açúcar, revelou a presença de diversos gêneros bacterianos de grande importância nos estudos de promoção de crescimento vegetal, como *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea* (Tabela 7). Não foi possível fazer a identificação genética dos isolados bacterianos UAGF05 e UAGF14, devido ao baixo número de pares de bases (pb) obtidos no sequenciamento.

**Tabela 7.** Identificação por meio de análise de ácidos graxos e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA de isolados bacterianos associados à cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.).

Isolado bacteriano	FAME		Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA		
	Espécie mais próxima	Índice Sim*	Espécie mais próxima	Índice Sim*	Nº de acesso
UAGF02	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,728	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	94%	NR_074686.1
UAGF05	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,951	-	-	-
UAGF14	<i>Pseudomonas putida</i>	0,693	-	-	-
UAGF19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,814	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	90%	NR_103936.1
UAGF35	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,668	<i>Enterobacter aerogenes</i>	94%	NR_024643.1
UAGF49	<i>Escherichia coli</i>	0,793	<i>Enterobacter ludwigii</i>	94%	NR_042349.1
UAGF54	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,796	<i>Klebsiella variicola</i>	94%	NR_074729.1
UAGF60	<i>Escherichia coli</i>	0,648	<i>Pantoea dispersa</i>	94%	NR_043883.1

\*Índice sim = Índice de similaridade

Ferrara et al. (2012) salientam que os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* prevalecem em plantações de cana-de-açúcar. Já Kavamura et al. (2013), ao utilizar estas técnicas, em bactérias isoladas de regiões do Bioma Caatinga, verificaram que a maioria dos isolados pertenciam ao gênero *Bacillus*, bactérias que produzem endósporos.

Diversos autores ressaltam, ainda, que um único método, seja ele fenotípico ou genotípico, não é suficiente para a caracterização precisa de um organismo. Entretanto, técnicas clássicas e moleculares se complementam, permitindo a identificação das espécies (RIBEIRO, 2010). Nesse sentido, a análise do perfil de ácidos graxos, permite caracterizar isolados bacterianos a partir da análise de ácidos graxos presentes na membrana celular, inferindo diferenças qualitativas existentes entre gêneros bacterianos (SEKORA et al., 2009). Por outro lado, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permite a classificação e identificação de diversos grupos bacterianos, a partir do material genético, fazendo com que essas técnicas sejam eficientes na identificação de micro-organismos, especialmente bactérias (RIBERIRO, 2010).

### **3.8. Inoculação bacteriana em sementes de Sorgo e Milho**

#### **3.8.1. Sorgo forrageiro (*Sorgum vulgare*, var. IPA 467-4-2)**

A inoculação bacteriana não afetou o índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de sorgo forrageiro (*Sorgum vulgare*, Var. IPA 467-4-2). No entanto, houve diferença significativa da inoculação nas demais análises estudadas (Tabela 8).

Ao analisar a primeira contagem de sementes germinadas (PC), verificou-se que apenas os tratamentos T25 (UAGF44) e T26 (UAGF60) não obtiveram resultados significativos sobre esta característica em relação ao T1 (Controle - sem inoculo bacteriano), sendo os demais tratamentos, estatisticamente superiores. Os tratamentos T9 (UAGF18) e T19 (UAGF46) proporcionaram 100% de sementes germinadas na PC. Dessa forma relacionando o controle com os tratamentos inoculados, houve incremento de 19% da inoculação bacteriana sobre essa característica.

Associando esses dados aos testes de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, verificou-se que o isolado UAGF44 apresentou a menor produção de AIA, e a bactéria UAGF60 além de sintetizar pouco fitormônio (AIA) foi também negativa ao teste da



molécula *quorum sensing*. Glick (2012) ressalta que é necessário realizar estudos de síntese de AIA por micro-organismos, para se conhecer os verdadeiros efeitos sob o crescimento de plantas, visto que, as respostas das plantas ao AIA produzido, pode variar de efeitos benéficos a deletérios, dependendo de sua concentração. Runjanek et al. (2004) destacaram ainda, que a produção de QS melhora a colonização de bactérias à planta hospedeira.

Em relação às análises de comprimento de radícula, parte aérea e total, observou-se que os tratamentos T2 (UAGF01), T3 (UAGF05), T4 (UAGF06), T6 (UAGF14), T7 (UAGF16), T8 (UAGF17), T9 (UAGF18), T10 (UAGF25), T11 (UAGF26), T15(UAGF29), T24 (UAGF55) e T25 (UAGF44) proporcionaram maiores comprimentos de radícula, com valores variando de 7,659 à 9,228 cm; já os tratamentos T3 (UAGF05), T4 (UAGF06), T5 (UAGF12), T8 (UAGF17), T9 (UAGF18) e T10 (UAGF25) proporcionaram maior parte aérea (8,075 à 8,939 cm); e os tratamentos T2 (UAGF01), T3 (UAGF05), T4 (UAGF06), T5 (UAGF12), T8 (UAGF17), T9 (UAGF18), T10 (UAGF25) e T11 (UAGF26) valores superiores de comprimento total de plântulas (15,935 à 17,391 cm). Ressalta-se que o tratamento sem inoculação bacteriana (T1), ou seja, o controle, resultou nos menores valores de comprimento de radícula (7,511 cm), parte aérea (6,162 cm) e total (13, 673 cm) das plântulas. Dessa forma, verificou-se o incremento da inoculação bacteriana, sob essas três características, em relação ao controle, de 22,8%; 45,0% e 27,2% no comprimento de radícula, parte aérea e total das plântulas de sorgo, respectivamente. Montañez et al. (2012) também obtiveram resultados positivos com a inoculação de BPCV em sementes de milho, de 22 isolados avaliados em relação à promoção de crescimento, dez promoveram aumento nas análises avaliadas, dentre elas, comprimento de parte aérea e raiz.

Correlacionando esses resultados com os testes de promoção de crescimento vegetal, verificou-se que todos os isolados bacterianos fixaram nitrogênio atmosférico, solubilizaram fosfato inorgânico e produziram a molécula QS, *in vitro*. Entretanto, fato interessante foi constatado com os tratamentos T17 (UAGF35) e T22 (UAGF49) que proporcionaram menores valores de crescimento de radícula, parte aérea e total das plântulas, porém, expressaram a maior produção do fitormônio AIA. Essa característica pode ser atribuída ao fato de que altas concentrações de AIA podem inibir o crescimento da planta, afetando o seu desenvolvimento (LEITE et al., 2014).

Considerando os resultados de fitomassa total fresca, observou-se que os tratamentos com inoculação bacteriana T4 (UAGF06), T5 (UAGF12), T8 (UAGF17), T9 (UAGF18), T11 (UAGF26), T22 (UAGF53), T23 (UAGF54), T24 (UAGF55) e T26 (UAGF60) proporcionaram os melhores resultados (0,094 à 0,103 g), sendo superiores estatisticamente aos demais tratamentos (Tabela 8). Nesse mesmo sentido, os tratamentos T15 (UAGF29), T16 (UAGF31), T17 (UAGF35), T18 (UAGF39), T20 (UAGF48), T21 (UAGF49), T22 (UAGF53), T23(UAGF54) e T24 (UAGF55) proporcionaram maior produção de fitomassa total seca, com valores variando de 0,017 à 0,020 g. Mais uma vez, o tratamento sem inoculação bacteriana (T1) foi inferior estatisticamente, com produção de fitomassa total fresca e seca de 0,070 e 0,13g, respectivamente.

Ainda sobre o incremento da inoculação bacteriana sobre os dados de fitomassa total fresca e seca, observou-se que alguns tratamentos com inoculação contribuíram com 47,15% e 53,85%, sobre tais características, quando comparadas ao controle. Destaca-se, mais uma vez, que esses isolados foram positivos para os testes de mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ji et al. (2014) que ao isolar 576 bactérias endofíticas de cultivares de arroz, verificaram que as sementes inoculadas com tais bactérias apresentaram maior crescimento das plantas, em relação à altura e peso seco, sendo ainda, possível, verificar efeitos antagônicos dessas bactérias contra fitopatógenos. Knoth et al. (2013) salientam que muitas culturas agrícolas podem se beneficiar com a inoculação de BPCV, através da obtenção de produção de biomassa mais eficiente e com menos entrada de fertilizantes derivados de petróleo, podendo assim alcançar uma agricultura sustentável.

**Tabela 8.** Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. IPA 467-4-2), após a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Tratamento	Germinação*		Comprimento*			Fitomassa Total*	
	IVG -----	PC (%)	Radícula -----	Parte aérea (cm) -----	Total -----	Fresca -----	Seca (g) -----
T1 – Controle	5,50 a	84,00 b	7,511 b	6,162 c	13,673 c	0,070 d	0,013 b
T2 - UAGF01	5,88 a	<b>92,00 a</b>	<b>9,112 a</b>	7,189 b	<b>16,301 a</b>	0,080 c	0,013 b
T3 - UAGF05	6,08 a	<b>97,33 a</b>	<b>8,483 a</b>	<b>8,075 a</b>	<b>16,557 a</b>	0,088 b	0,010 b
T4 - UAGF06	5,99 a	<b>90,67 a</b>	<b>7,765 a</b>	<b>8,169 a</b>	<b>15,935 a</b>	<b>0,097 a</b>	0,010 b
T5 - UAGF12	5,90 a	<b>93,33 a</b>	7,481 b	<b>8,535 a</b>	<b>16,016 a</b>	<b>0,097 a</b>	0,010 b
T6 - UAGF14	5,92 a	<b>89,33 a</b>	<b>8,112 a</b>	6,637 c	14,749 b	0,083 c	0,010 b
T7 - UAGF16	6,00 a	<b>96,00 a</b>	<b>7,925 a</b>	7,607 b	15,532 b	0,084 c	0,011 b
T8 - UAGF17	6,04 a	<b>96,00 a</b>	<b>8,295 a</b>	<b>8,253 a</b>	<b>16,548 a</b>	<b>0,096 a</b>	0,015 b
T9 - UAGF18	6,25 a	<b>100,00 a</b>	<b>7,907 a</b>	<b>8,939 a</b>	<b>16,845 a</b>	<b>0,103 a</b>	0,014 b
T10 - UAGF25	6,08 a	<b>97,33 a</b>	<b>9,228 a</b>	<b>8,163 a</b>	<b>17,391 a</b>	0,090 b	0,012 b
T11 - UAGF26	5,89 a	<b>93,33 a</b>	<b>8,387 a</b>	7,875 b	<b>16,261 a</b>	<b>0,098 a</b>	0,012 b
T12 - UAGF02	6,07 a	<b>96,00 a</b>	7,265 b	5,287 c	12,552 c	0,070 d	0,010 b
T13 -UAGF19	5,92 a	<b>94,67 a</b>	5,804 b	6,147 c	11,951 c	0,078 c	0,013 b
T14 - UAGF28	6,23 a	<b>98,67 a</b>	6,877 b	5,087 c	11,964 c	0,083 c	0,010 b
T15 - UAGF29	6,13 a	<b>96,00 a</b>	<b>8,547 a</b>	6,769 c	15,316 b	0,088 b	<b>0,020 a</b>
T16 - UAGF31	6,08 a	<b>97,33 a</b>	7,561 b	5,644 c	13,205 c	0,082 c	<b>0,020 a</b>
T17 - UAGF35	6,15 a	<b>97,33 a</b>	6,163 b	6,497 c	12,660 c	0,089 b	<b>0,020 a</b>
T18 - UAGF39	6,15 a	<b>97,33 a</b>	6,937 b	6,025 c	12,963 c	0,086 c	<b>0,020 a</b>
T19 - UAGF46	6,25 a	<b>100,00 a</b>	7,287 b	6,119 c	13,405 c	0,091 b	0,013 b
T20 - UAGF48	6,17 a	<b>98,67 a</b>	7,172 b	6,433 c	13,605 c	0,091 b	<b>0,020 a</b>
T21 - UAGF49	6,15 a	<b>97,33 a</b>	6,493 b	5,784 c	12,277 c	0,084 c	<b>0,017 a</b>
T22 - UAGF53	6,08 a	<b>97,33 a</b>	6,896 b	6,789 c	13,685 c	<b>0,101 a</b>	<b>0,020 a</b>
T23 - UAGF54	5,92 a	<b>94,67 a</b>	6,716 b	6,041 c	12,757 c	<b>0,094 a</b>	<b>0,020 a</b>
T24 - UAGF55	6,17 a	<b>98,67 a</b>	<b>7,880 a</b>	6,460 c	14,340 c	<b>0,097 a</b>	<b>0,020 a</b>
T25 - UAGF44	5,89 a	76,00 b	<b>7,659 a</b>	7,135 c	14,793 b	0,090 b	0,013 b
T26 - UAGF60	5,96 a	80,00 b	7,193 b	7,752 b	14,945 b	<b>0,095 a</b>	0,015 b
<b>CV (%)</b>	<b>3,79</b>	<b>4,80</b>	<b>9,18</b>	<b>7,06</b>	<b>6,70</b>	<b>6,92</b>	<b>8,99</b>

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. IVG = Índice de velocidade de germinação; PC = Primeira contagem de sementes.

### 3.8.2. Milho (*Zea mays*, var. São José)

A inoculação bacteriana teve efeito significativo sobre todas as variáveis analisadas em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José), exceto na análise de fitomassa total seca – Tabela 9.

Observando o índice de velocidade de germinação (IVG) verificou-se o efeito positivo da inoculação bacteriana, incrementando em 12,2% esta característica, exceto para o T10 (UAGF25), que não diferiu do tratamentos T1 (Controle). Já ao se avaliar a primeira contagem de sementes (PC), a inoculação não teve efeito significativo nos tratamentos T1 (Controle), T3 (UAGF05), T4 (UAGF06), T5 (UAGF12), T6 (UAGF14), T7 (UAGF16), T8 (UAGF17), T9 (UAGF18), T10 (UAGF25) e T11 (UAGF26), sendo os demais tratamentos estatisticamente superiores, onde o incremento chegou a ser de 13,6% - Tabela 8. Relacionando esses dados com os resultados dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, verificou-se que dentre as diversas características avaliadas, esses isolados sintetizaram pouco AIA, entre 7,06 a 72,91  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Em relação às análises de comprimento de radícula, parte aérea e total, observou-se que os tratamentos T15 (UAGF29), T16 (UAGF31), T20 (UAGF46), T21 (UAGF48), T22 (UAGF49), T23 (UAGF53), T24 (UAGF54), T25 (UAGF55) e T26 (UAGF60), tiveram plântulas com maior comprimento de radícula, entre 15,061 cm e 16,677 cm; já as bactérias inoculadas dos tratamentos T10 (UAGF25), T11 (UAGF26), T15 (UAGF29), T16 (UAGF31), T18 (UAGF39), T19 (UAGF44), T22 (UAGF49), T23 (UAGF53) e T24 (UAGF54) proporcionaram maior comprimento de parte aérea (6,596 à 7,788 cm); e, os tratamentos T15 (UAGF29), T16 (UAGF31), T19 (UAGF44), T20 (UAGF46), T21 (UAGF48), T22 (UAGF49), T23 (UAGF53), T24 (UAGF54), T25 (UAGF55) e T26 (UAGF60) conferiram plântulas com maior comprimento total (21,795 à 24,152 cm). Ressalta-se que o tratamento sem inoculação bacteriana (T1), resultaram nos menores valores de comprimento de radícula (13,871 cm), parte aérea (5,315 cm) e total (19,185 cm) – Tabela 9. Assim, observa-se incremento da inoculação de 20,2% (radícula), 46,5% (parte aérea) e 25,9% sobre as essas três características analisadas.

Correlacionando esses resultados com os testes de promoção de crescimento vegetal, verificou-se que todos os isolados bacterianos que promoveram algum

incremento sobre o crescimento das plântulas, fixaram nitrogênio atmosférico, solubilizaram fosfato inorgânico ou produziram a molécula QS, *in vitro*. Wu et al. (2012) ao inocular a linhagem *Rautoltella planticola*, diazotrófica e solubilizadora de fosfato inorgânico, em sementes de algodão, viram que o tratamento com essa bactéria proporcionou aumento de 29,5%; 15,0%; 33,7% e 33,3% sob as taxas de germinação, altura de planta, peso fresco e peso seco, respectivamente, quando comparado ao controle (sem inoculação).

Castro & Pereira (2014) ao testar bactérias solubilizadoras de fosfato quanto aos efeitos de promoção em sementes de milho, em solos com deficiência de fósforo, viram que a inoculação bacteriana proporcionou maiores rendimentos de raiz e parte aérea, chegando esse aumento a ser de 102,0% e 63,0% respectivamente, quando comparado ao controle (sem inoculo bacteriano). Dawwam et al. (2013) também alcançaram resultados positivos ao isolar bactérias associadas às raízes de plantas de batata-doce e avaliar suas potencialidades funcionais em relação a promoção de crescimento. Os tratamentos inoculados com as bactérias apresentam maiores valores de pigmentos fotossintéticos, crescimento vegetativo e concentração de nutrientes, em relação ao tratamento controle.

Analisando os resultados de fitomassa total fresca, observou-se que nos tratamentos T2 (UAGF01), T3 (UAGF05), T4 (UAGF06), T5 (UAGF12), T14 (UAGF28), T15 (UAGF29), T16 (UAGF31), T17 (UAGF35), T18 (UAGF39) e T19 (UAGF44) a inoculação bacteriana não teve efeito significativo quando comparado ao T1 (controle), sendo, esses tratamentos estatisticamente inferiores aos demais. Os isolados bacterianos que promoveram aumento na fitomassa total fresca das plântulas (1,078 a 1,173 g) proporcionaram um incremento de 9,15% quando comparado ao controle (T1). Mais uma vez, o tratamento T1, apresentou os menores resultados, 1,072g (Tabela 9).

Em relação aos dados de fitomassa total seca, não foi possível ver diferença significativa entre os tratamentos sem e com inoculação bacteriana. Esses dados contradizem aos encontrados por Saïdi et al. (2013), que ao testar 104 isolados bacterianos associados à raiz de feijão tipo fava, verificou que 9 cepas induziram aumento significativo de 71% na fitomassa seca.

**Tabela 9.** Germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José), após a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Tratamento	Germinação*		Comprimento*			Fitomassa Total*	
	IVG	PC	Radícula	Parte aérea	Total	Fresca	Seca
	-----	- (%) -	-----	(cm) -----	-----	----- (g) -----	-----
T1 - Controle	5,57 b	88,00 b	13,871 b	5,315 b	19,185 b	1,072 b	0,304 a
T2 - UAGF01	<b>6,17 a</b>	<b>93,33 a</b>	13,903 b	5,485 b	19,388 b	1,042 b	0,274 a
T3 - UAGF05	<b>6,02 a</b>	81,33 b	13,823 b	5,645 b	19,468 b	1,065 b	0,297 a
T4 - UAGF06	<b>6,06 a</b>	85,33 b	14,240 b	5,337 b	19,577 b	1,059 b	0,285 a
T5 - UAGF12	<b>6,03 a</b>	84,00 b	13,192 b	5,189 b	18,381 b	1,035 b	0,289 a
T6 - UAGF14	<b>6,07 a</b>	86,67 b	14,173 b	6,100 b	20,273 b	<b>1,083 a</b>	0,296 a
T7 - UAGF16	<b>6,05 a</b>	86,67 b	13,019 b	5,813 b	18,832 b	<b>1,130 a</b>	0,291 a
T8 - UAGF17	<b>6,03 a</b>	82,67 b	14,793 b	5,935 b	20,728 b	<b>1,082 a</b>	0,271 a
T9 - UAGF18	<b>6,08 a</b>	86,67 b	14,356 b	6,249 b	20,605 b	<b>1,119 a</b>	0,298 a
T10 - UAGF25	5,76 b	82,67 b	14,085 b	<b>6,761 a</b>	20,847 b	<b>1,173 a</b>	0,287 a
T11 - UAGF26	<b>6,04 a</b>	84,00 b	14,279 b	<b>6,596 a</b>	20,875 b	<b>1,114 a</b>	0,288 a
T12 - UAGF02	<b>6,23 a</b>	<b>98,67 a</b>	13,532 b	6,448 b	19,980 b	<b>1,125 a</b>	0,302 a
T13 - UAGF19	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	14,784 b	6,036 b	20,820 b	<b>1,078 a</b>	0,273 a
T14 - UAGF28	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	13,105 b	5,916 b	19,021 b	1,067 b	0,283 a
T15 - UAGF29	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	<b>15,432 a</b>	<b>6,736 a</b>	<b>22,168 a</b>	1,025 b	0,276 a
T16 - UAGF31	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	<b>15,140 a</b>	<b>7,232 a</b>	<b>22,372 a</b>	1,021 b	0,285 a
T17 - UAGF35	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	14,772 b	6,168 b	20,940 b	0,982 b	0,287 a
T18 - UAGF39	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	14,731 b	<b>6,731 a</b>	21,461 b	0,990 b	0,279 a
T19 - UAGF44	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	14,669 b	<b>7,127 a</b>	<b>21,795 a</b>	1,023 b	0,290 a
T20 - UAGF46	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	<b>15,550 a</b>	8,144 b	<b>23,694 a</b>	<b>1,092 a</b>	0,269 a
T21 - UAGF48	<b>6,22 a</b>	<b>98,67 a</b>	<b>15,675 a</b>	7,796 b	<b>23,471 a</b>	<b>1,098 a</b>	0,294 a
T22 - UAGF49	<b>6,19 a</b>	<b>97,33 a</b>	<b>16,076 a</b>	<b>7,459 a</b>	<b>23,535 a</b>	<b>1,089 a</b>	0,284 a
T23 - UAGF53	<b>6,20 a</b>	<b>96,00 a</b>	<b>16,215 a</b>	<b>7,324 a</b>	<b>23,539 a</b>	<b>1,094 a</b>	0,281 a
T24 - UAGF54	<b>6,25 a</b>	<b>100,00 a</b>	<b>16,677 a</b>	<b>7,465 a</b>	<b>24,143 a</b>	<b>1,170 a</b>	0,285 a
T25 - UAGF55	<b>6,20 a</b>	<b>96,00 a</b>	<b>16,364 a</b>	<b>7,788 a</b>	<b>24,152 a</b>	<b>1,153 a</b>	0,289 a
T26 - UAGF60	<b>6,17 a</b>	<b>98,67 a</b>	<b>15,061 a</b>	<b>7,367 a</b>	<b>22,428 a</b>	<b>1,168 a</b>	0,257 a
CV (%)	<b>2,49</b>	<b>5,94</b>	<b>7,61</b>	<b>9,04</b>	<b>7,41</b>	<b>5,15</b>	<b>5,15</b>

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. IVG = Índice de velocidade de germinação; PC = Primeira contagem de sementes.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que:

- 1- Isolados bacterianos associadas às variedades RB92579 e RB867515 de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) não sofreram influência com a presença de NaCl, nas concentrações de 0 e 2,5%, em relação à fixação biológica de nitrogênio.
- 2- Todas as bactérias foram capazes de sintetizar AIA.
- 3- A maioria das bactérias produziu EPS e molécula *quorum sensing* (QS). Sendo que, 20,30% dos isolados avaliados, tiveram alta produção de EPS.
- 4- O nicho endofítico de raiz obteve maior percentagem de isolados bacterianos com alta e média produção de AIA e produtores da molécula QS.
- 5- A PCR específica identificou a presença de dois isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Burkholderia*.
- 6- O BOX-PCR permitiu observar elevada diversidade genética entre as bactérias avaliadas.
- 7- As técnicas de perfil de ácidos graxos e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu classificar as linhagens bacterianas à nível de espécie.
- 8- Bactérias associadas à cana-de-açúcar promoveram o crescimento de plântulas de sorgo forrageiro (*Sorgum vulgare*, var. IPA 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José) em condições laboratoriais. Podendo sugerir a aplicação das bactérias UAGF49, UAGF53, UAGF54, UAGF55 e UAGF60 (endofíticas de raiz) em tratamentos isolados e Mix bacteriano, em estudos de inoculação em ambiente protegido.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Effects of pesticides on plant growth promoting traits of Mesorhizobium strain MRC4. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 11, p. 63-71, 2012.

ARAÚJO, W. L.; LACAVAL, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Practice guide: Isolation and characterization of endophytic microorganisms**. Piracicaba: CALO, 2010. 167p.

BARBOSA, M. V. **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas em Pernambuco**. 72 p. 2010. (Monografia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE-UAG.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. **Plant Soil**, v. 378, p. 1 -33, 2014.

BHATTACHARYYA I, CHOUDHURY M. Quorum Sensing - Let Bacteria Talk. **Advanced Biotechnonology**, v. 7, p. 30-33, 2008.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promotion evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, n. 63, p. 94-104, 2013.

BOGAS, A. C. **Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros**. 151 p. 2010. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Universidade de São Paulo – ESALQ/USP.



CASTRO, P. M. L.; PEREIRA, S. I. A. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. **Ecological Engineering**, v. 73, p. 526-535, 2014.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 669 – 678, 2010.

COMPANT, S., REITER, B., SESSITSCH, A., NOWAK, J., CLEMENT, C., AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Applied Environmental Microbiology**, n.71, p.1685-1693, 2005.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

DAWWAM, G. E.; ELBELTAGY, A.; EMARA, H. M.; ABBAS, I. H.; HASSAN, M. M. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, n. 2, p. 195 – 201, 2013.

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

EMBRAPA Milho e Sorgo. **Sistemas de produção – Cultivo do Sorgo**, versão eletrônica – 4ª edição, 2008.

FERRARA, F. I. S.; OLIVEIRA, Z. M.; GONZALES, H. H. S.; FLOH, E. I. S.; BARBOSA, H. R. B. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar

cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, v. 353, p. 409-417, 2012.

GOMES, W. S.; BORÉM, A. Biotecnologia: novo paradigma do Agronegócio Brasileiro. **Revista de economia e agronegócio**, v. 11, n. 1, p. 1 -22, 2012.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, p. 83-98, 2014.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; ÁVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, n. 168, p. 183 – 191, 2013.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. 2012. 246f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência, Universidade de São Paulo – ESALQ.

KNOTH, J. L.; KIM, S. H.; ETTL, G. J.; DOTY, S. L. Effects of cross host species inoculation of nitrogen-fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. **GCB Bioenergy**, v. 5, n. 4, p. 408-418, 2013.

LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, (Suplemento), p. S73–S79, 2014.

LIMA, D. R. M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado). 110 p. 2012. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para Análise de sementes (RAS)**. Brasília, 399p. 2009.

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

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, n. 54, p. 21-28, 2012.

OLIVEIRA, J. T. C. **Caracterização fisiológica e genética de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a capim braquiária**. 130p. 2012. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Pastagem – Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns.

OLIVEIRA, G. P. **Maturação e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 99 p. 2012. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

PACHECO, A. M.; SANTOS, I. R. C.; HAMZÉ, A. L. The importance of agribusiness in Brazil – literature review. **Revista Científica de Medicina veterinária**, n. 19, p. 1 - 6, 2012.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da

salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 112-121, 2012.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with Field-grown maize and sugarcane. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006.

QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; ROSSETOO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P. T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7511-7518, 2012.

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 1183-1191, 2012.

RAMOS, A. P. S. **Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: diversidade genética e produção de ácido indol acético**. 128 p. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RIBEIRO, C. M. **Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia***. 99 p. 2010. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Universidade de São Paulo – ESALQ/USP.

ROCHA, U. N.; ANDREOTE F. D.; AZEVEDO, J. L.; VAN ELSAS, J. D.; VAN OVERBEEK, L. S. Cultivation of hitherto-uncultured bacteria belonging to the *Verrucomicrobia* subdivision 1 from the potato (*Solanum tuberosum* L.) rhizosphere. **Journal Soils Sediments**, v. 10, p. 326-339, 2010.

RODRIGUES, J. A. S.; TOMICH, T. R.; GONÇALVES, L. C.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; GUIMARÃES, A. S.; FERNANDES, L. O.; PAES, J. M. V. Sorgo forrageiro para silagem, corte e pastejo. **Informe Agropecuário**, v.35, n. 278, p. 50-62, 2014.

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C.; XAVIER, G.R. *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 35-50, 2004.

SAÏDI, S. CHEBIL, S.; GTARI, M.; MHAMBI, R. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 1099-1106, 2013.

SANTOS, I. B. **Bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico associadas a plantas de cana-de-açúcar: isolamento, variabilidade genética e potencial biotecnológico.** 73 p. 2013. Monografia (Graduação). Universidade Federal de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAI, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n.1, p. 142-149, 2012.

SEKORA, N. S.; LAWRENCE, K. S.; AGUDELO, P.; SANTEN, E. V.; MCINROY, J. A. Using FAME analysis to compare, differentiate, and identify multiple nematode species. **Journal of Nematology**, v. 41, n. 3, p. 163-173, 2009.

SILVA, F. G. **Bactérias halotolerantes associadas a plantas de *Atriplex mummularia* L. e sua inoculação em mudas.** 90 p. 2014. Dissertação (Mestrado). Pós Graduação em Produção Agrícola - Universidade Federal de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns.

SILVA, M. C. P.; FIGEUIREDO, A. F.; ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Plant growth promoting bacteria in *Brachiaria brizantha*. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 29, p. 163-172, 2013.

TAKASU, A. T.; RODRIGUES, A. F.; GOES, R. J.; HAGA, K. I.; ARF, O.; GITTI, D. C. Características agronômicas da cultura do milho em função do preparo de solo e arranjo espacial de plantas. **Revista Agrarian**, v. 7, n. 26, p. 485 – 495, 2014.

WU, Z.; YUE, H.; LU, J.; LI, C. Characterization of rhizobacterial strains Rs-2 with ACC deaminase activity and its performance in promoting cotton growth under salinity stress. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 2383-2393, 2012.

**ANEXO**

Identificação fenotípica dos isolados bacterianos inoculados em sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum vulgare*, var. IPA 467-4-2) e milho (*Zea mays*, var. São José).

Isolados bacterianos	Variedade	Nicho	SPi		FBN	AIA	QS	EPS
			pH 7,2	pH 5,5				
UAGF 01	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 02	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	-	+
UAGF 04	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	-	+
UAGF 05	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 06	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 07	RB 92579	RIZ	+	-	+	+	+	+
UAGF 09	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	-	+
UAGF 10	RB 92579	RIZ	-	-	+	+	-	+
UAGF 11	RB 92579	RIZ	-	-	+	+	-	+
UAGF 12	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 13	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 14	RB 92579	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 15	RB 92579	RIZ	+	-	+	+	+	+
UAGF 16	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 17	RB 92579	ER	+	+	+	+	-	+
UAGF 18	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 19	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 20	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 21	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 22	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 23	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 24	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 25	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 26	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 27	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 28	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 29	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 30	RB 92579	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 31	RB 867515	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 33	RB 867515	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 35	RB 867515	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 36	RB 867515	RIZ	-	-	+	+	+	+
UAGF 37	RB 867515	RIZ	-	-	+	+	+	+
UAGF 39	RB 867515	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 40	RB 867515	RIZ	-	-	+	+	+	+
UAGF 41	RB 867515	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 42	RB 867515	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 44	RB 867515	RIZ	+	+	+	+	+	+
UAGF 46	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+



UAGF 47	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 48	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 49	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 50	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 51	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 52	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 53	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 54	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 55	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 56	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 57	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 58	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 59	RB 867515	ER	+	+	+	+	+	+
UAGF 60	RB 867515	ER	+	+	+	+	-	+

ER: Endofítico de raiz; RIZ: Rizosfera; + : Positivos para a característica avaliada; - : Negativo para característica avaliada; SPi: Solubilização de fosfato inorgânico; FBN: Fixação biológica de nitrogênio; AIA: Produção de ácido indol acético (AIA) na presença de 5 mM de L-triptofano; QS: Produção da molécula *quorum sensing*; EPS: Produção de exopolissacarídeos.

---

---

**CAPÍTULO II**

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL POR LINHAGENS**

**BACTERIANAS PERTENCENTES AO GÊNERO *Burkholderia***

---

---

## RESUMO

Nos últimos anos, atenção especial tem sido dada ao gênero *Burkholderia*, principalmente devido à grande versatilidade metabólica e capacidade de colonizar diferentes nichos. Muitos estudos demonstram o grande potencial biotecnológico dessas bactérias, incluindo degradação de diferentes compostos aromáticos e moléculas tóxicas; colonização de plantas através de mecanismos de promoção de crescimento vegetal; e ainda, por formarem relações simbióticas com os vegetais. Portanto, através deste trabalho objetivou-se, testar linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*, quanto à capacidade de sintetizar ácido indol acético (AIA) sob diferentes fatores abióticos, produzir exopolissacarídeos e moléculas *quorum sensing*; bem como, estudar a diversidade genética e o potencial de promoção de crescimento vegetal em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José). A seleção de bactérias com diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal foi realizada através dos testes de síntese de ácido indol acético (AIA) sob a presença de diferentes fatores abióticos; expressão da molécula *quorum sensing* (ALH) e produção de exopolissacarídeos (EPS). O estudo da diversidade genética foi realizado através da técnica de REP-PCR. As bactérias positivas para os diversos mecanismos de promoção foram utilizadas na inoculação de sementes de milho (*Zea mays*, var. São José) para avaliar o desempenho de tais bactérias sobre a promoção vegetal. Os resultados indicaram que todas as linhagens foram capazes de sintetizar AIA sob a presença e/ou ausência de L-triptofano, pH ácido (4,5) e básico (7,2); presença de 1,0 e 5,0% de NaCl; quanto a produção de EPS, 61,54% das linhagens avaliadas foram positivas ao teste; apenas a linhagem UAGC131 obteve halo de produção menor que 10 mm de diâmetro (pouca produção), o que corresponde a 3,85% da frequência relativa; 19,23% tiveram média produção de EPS e 38,46% apresentaram alta produção de EPS. A produção da molécula *quorum sensing* (AHL) foi constatada em 92,30% das linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*. O coeficiente de similaridade de *Jaccard*, através da técnica de REP-PCR, evidenciou a presença de 17 grupos (*clusters*), com alta variabilidade genética entre as linhagens avaliadas, a 30% de similaridade. A inoculação bacteriana não afetou o índice de velocidade de germinação (IVG) e a primeira contagem de sementes germinadas (PC). No entanto, aumentou os resultados de comprimento de radícula (14,424 cm – G28 *B. heleaia*), parte aérea (5,715 cm – UAGC723 *B. gladioli*), total (19,868 cm – UAGC871 *Burkholderia* sp.), fitomassa total fresca e seca (1,076 g e 0,291 g – UAGC348 *B. graminis*), cujo incremento da inoculação chegou a 1,67%, 11,79%, 1,38%, 2,57% e 3,93%, respectivamente. Esses resultados indicam que bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* possuem potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal em condições laboratoriais, necessitando, portanto, de testes em ambiente protegido e em campo para confirmar o potencial dessas bactérias.

Palavras-chave: Mecanismos diretos; inoculação bacteriana, milho.

## ABSTRACT

In recent years, special attention has been paid to the genus *Burkholderia*, mainly due to the great metabolic versatility and ability to colonize different niches. Many studies have shown the great biotechnological potential of these bacteria, including degradation of different aromatic compounds and toxic molecules; colonization of plants through plant growth promotion mechanisms; and yet, because of forming symbiotic relationships with plants. Therefore, the main objective of this work was to test bacterial strains belonging to the genus *Burkholderia*, for the ability to synthesize indole acetic acid (IAA) under different abiotic factors, produce exopolysaccharides and *quorum sensing* molecules; as well as study the genetic diversity and the potential for plant growth promotion in maize (*Zea mays* var. Sao Jose). The selection of bacteria with different mechanisms of plant growth promotion were performed using indole acetic acid synthesis tests (IAA) in the presence of different abiotic factors; expression of quorum sensing molecule (HLA) and exopolysaccharide (EPS). The study of genetic diversity was performed through the REP-PCR. The positive bacteria to promote various mechanisms have been used in the inoculation of maize (*Zea mays* var. Sao Jose) to assess the performance of such bacteria on promoting plant. The results showed all the lineages were able to synthesize under the IAA presence and / or absence of L-tryptophan, acid pH (4.5) and basic (7.2); the presence of 1.0 and 5.0% NaCl; how much the EPS production, 38.46% of tested strains were negative to the test; UAGC131 strain had only minor production of halo 10 mm diameter (low output), which corresponds to 3.85% of relative frequency; 19.23% had average production of EPS and 38.46% had high production of EPS. The production of *quorum sensing* molecule (AHL) was found in 92.30% of bacterial strains belonging to the genus *Burkholderia*. The *Jaccard* similarity coefficient by REP-PCR, revealed the presence of 17 groups (*clusters*) with high genetic variability between strains evaluated, 30% similarity. Bacterial inoculation did not affect the germination speed index (IVG) and the first count of germinated seeds (PC). However, increased the results of radicle (14.424 cm - G28 *B. Heleia*), shoot (5.715 cm - UAGC723 *B. gladioli*), total (19.868 cm - UAGC871 *B. sp*), total fresh and dry phytomass (1.076 g 0.291 g - UAGC348 *B. graminis*), the increase of inoculation reached 1.67%, 11.79%, 1.38%, 2.57% and 3.93%, respectively. These results showed that the genus *Burkholderia* bacteria belonging have biotechnological potential to promote plant growth out under laboratory conditions, requiring therefore tests in greenhouse and field to confirm the potential of these bacteria.

Keywords: direct mechanisms; bacterial inoculation, maize

## 1. INTRODUÇÃO

Os solos são considerados sistemas dinâmicos, onde aspectos físicos, químicos e biológicos estão em constante interação, servindo de suporte básico para o desenvolvimento de agroecossistemas. Os micro-organismos são componentes essenciais desse sistema, atuando na manutenção de ciclos biogeoquímicos e fornecendo nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas (ANDRADE, 2013).

A microbiota do solo compreende uma das principais fontes de diversidade do planeta, compondo os três domínios evolutivos *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. Estima-se que em um grama de solo, existe de 15 a 30 mil diferentes espécies de bactérias (ROESCH et al., 2007). Diversos trabalhos identificaram esta diversidade bacteriana associadas às mais diferentes espécies de plantas, como em soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), cana-de-açúcar (CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011; LEITE et al., 2014) e canola (FARINA et al., 2012).

O crescimento de plantas e produtividade das culturas é fortemente influenciado pelas interações entre bactéria/solo/planta (PEREG et al., 2015). A rizosfera é o volume de raízes do solo circundante, que abriga uma gama de micro-organismos, a qual é influenciada quimicamente, fisicamente e biologicamente pelas raízes, e, que têm influência sobre o desenvolvimento das plantas e fertilidade do solo (HARIPRASAD et al., 2014).

Bactérias endofíticas podem ocorrer em todas as espécies de plantas e, contribuem para seu desenvolvimento, através da produção de substâncias que proporcionam proteção e aumento da sobrevivência das plantas, sem causar qualquer sinal de infecção ou produção de efeitos negativos, sendo potencialmente explorada para fins medicinais, agrícolas e industriais (LIU et al., 2015).

Por sua vez, bactérias epifíticas (rizoplano) vivem na superfície de plantas, as quais têm a colonização controlada por diversos fatores biológicos, como crescimento da planta hospedeira, variações de umidade, temperatura, precipitação, entre outros. Esses micro-organismos ocupam um nicho ecológico estreito, por causa da sua existência na interface da vegetação e atmosfera. Entretanto, apresentam grande potencial nos estudos de produção de inoculantes microbianos (JOSHI et al., 2014).

Os micro-organismos que desempenham algum mecanismo de promoção de crescimento em plantas são conhecidos como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Dentre os diversos benefícios que as BPCV proporcionam pode-se citar a supressão de doenças (controle biológico), aumento da disponibilidade de nutrientes (biofertilizante) e produção de fitohormônios (fitoestimulação) (BHATTACHARYYA & JHA, 2012). Diferentes mecanismos diretos realizados pelas BPCV têm sido propostos como: capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfato inorgânico, elementos essenciais para o crescimento vegetal; produção de fitohormônios como auxina, giberelina e citocininas, responsáveis pela modulação da planta; produção de enzimas, como a ACC deaminase, responsável por diminuir os níveis de etileno nas raízes, dentre outros (POUPIN et al., 2013).

Nesse contexto, nos últimos anos, atenção especial tem sido dada ao gênero *Burkholderia*, principalmente devido à grande versatilidade metabólica e capacidade de colonizar diferentes nichos (COUTINHO et al., 2013). Atualmente, este gênero compreende mais de 88 espécies descritas, as quais estão subdivididas em diversos *clades* (grupos), nos quais se destaca o grupo conhecido como PBE (*plant-beneficial-environmental*), que fez mudar a percepção sobre o conhecimento das bactérias pertencentes a este gênero (SUÁREZ-MORENO et al., 2012). Essa mudança se deu devido aos muitos estudos, que demonstraram o grande potencial biotecnológico dessas bactérias, incluindo degradação de diferentes compostos aromáticos e moléculas tóxicas; colonização de plantas através de mecanismos de promoção citados acima; e ainda, por formarem relações simbióticas com os vegetais (TALBI, et al., 2010).

Assim, uns dos principais objetivos da biotecnologia agrícola têm sido desenvolver inoculantes microbianos capazes de promover o crescimento vegetal e suprimir doenças de plantas, tendo como intuito reduzir o uso de fertilizantes químicos e pesticidas (ADESEMOYE et al., 2009). Entretanto muitos fatores precisam ser considerados durante o desenvolvimento de tais inoculantes comerciais, incluindo a seleção de BPCV com base na cultura alvo, tipo de solo, comunidades microbianas indígenas, condições ambientais, dentre outros (PEREG et al., 2015).

Portanto, diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*, quanto à capacidade de sintetizar ácido indol acético (AIA) sob diferentes fatores abióticos, produzir exopolissacarídeos e

moléculas *quorum sensing*; bem como, estudar a diversidade genética e o potencial de promoção de crescimento vegetal em plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Linhagens bacterianas

As vinte e seis linhagens bacterianas analisadas são provenientes da associação com diferentes plantas (cana-de-açúcar e mandioca), variedades e nichos (Tabela 1), e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, da Unidade Acadêmica de Garanhuns, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – LGBM/UAG/UFRPE - as quais foram caracterizadas, como promotoras de crescimento vegetal, quanto à fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato inorgânico, *in vitro* (BARROS, 2010; COSTA, 2010; LIMA, 2012). A tabela 2 mostra as linhagens bacterianas identificadas, cuja análise filogenética já foi previamente realizada (LIMA, 2012).

**Tabela 1.** Descrição das linhagens bacterianas em associadas à diferentes plantas, variedades e nichos.

<b>Linhagem Bacteriana</b>	<b>Planta</b>	<b>Variedade</b>	<b>Nicho</b>
UAGC76	Cana-de-açúcar	RB863129	Endofítica de raiz – ER
UAGC78	Cana-de-açúcar	RB863129	Endofítica de raiz – ER
UAGC105	Cana-de-açúcar	RB863129	Rizoplano – RZP
UAGC114	Cana-de-açúcar	RB867515	Rizoplano – RZP
UAGC125	Cana-de-açúcar	RB863129	Rizoplano – RZP
UAGC127	Cana-de-açúcar	RB863129	Rizoplano – RZP
UAGC130	Cana-de-açúcar	RB863129	Rizoplano – RZP
UAGC131	Cana-de-açúcar	RB863129	Rizoplano – RZP
UAGC348	Cana-de-açúcar	RB863129	Endofítica de raiz – ER
UAGC723	Cana-de-açúcar	RB867515	Endofítica de raiz – ER
UAGC739	Cana-de-açúcar	RB92579	Endofítica de raiz – ER
UAGC740	Cana-de-açúcar	RB92579	Endofítica de raiz – ER
UAGC741	Cana-de-açúcar	RB92579	Endofítica de raiz – ER
UAGC745	Cana-de-açúcar	RB92579	Endofítica de raiz – ER
UAGC 857	Cana-de-açúcar	RB 92579	Endofítica de raiz – ER
UAGC 867	Cana-de-açúcar	RB 867515	Endofítica de raiz – ER
UAGC 871	Cana-de-açúcar	RB 867515	Rizosfera – RIZ
UAGC 904	Cana-de-açúcar	RB 867515	Rizosfera – RIZ
UAGC 913	Cana-de-açúcar	RB 867515	Rizosfera – RIZ
UAGC 942	Cana-de-açúcar	RB 92579	Rizosfera – RIZ
G1	Cana-de-açúcar	RB92579	Endofítica de colmo – EC
G2	Cana-de-açúcar	RB92579	Endofítica de colmo – EC
G10	Cana-de-açúcar	RB867515	Endofítica de colmo – EC
G28	Cana-de-açúcar	RB863129	Endofítica de raiz - ER
G29	Cana-de-açúcar	RB867515	Endofítica de colmo - EC



G83 Mandioca - Endofítica de colmo - EC

Fonte: Barros (2010); Costa (2010); Lima (2012)

**Tabela 2.** Identificação genética de linhagens bacterianas associadas a plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.).

<b>Linhagem bacteriana</b>	<b>Identificação</b>	<b>Similaridade %</b>
UAGC 857	<i>Burkholderia</i> sp.	92
UAGC 867	<i>Burkholderia</i> sp.	79
UAGC 871	<i>Burkholderia</i> sp.	85
UAGC 895	<i>Burkholderia</i> sp.	89
UAGC 904	<i>Burkholderia</i> sp.	87
UAGC 913	<i>Burkholderia</i> sp.	76
UAGC 942	<i>Burkholderia</i> sp.	86

Fonte: Lima, 2012

## 2.2. Avaliação da produção de ácido indol acético (AIA) sob diferentes fatores abióticos

### 2.2.1. Influência da ausência e presença do L-triptofano

As linhagens bacterianas foram avaliadas quanto à produção de AIA sob a ausência e presença do precursor L-triptofano, *in vitro*, por meio do método colorimétrico e específico que caracteriza a produção deste fitormônio (CROZIER et al., 1988). As bactérias foram inoculadas em placas de Petri, contendo meio TSA sólido 10% (*Trypase Soy Agar*). Após 24 horas, foram coletadas colônias isoladas, as quais foram inoculadas em meio líquido TSA 10%, sem triptofano. Constatado o crescimento bacteriano, 10 µL do inóculo foi transferido para tubos contendo meio líquido TSA 10% acrescido de 0 e 5 mM de L-triptofano (ausência e presença do precursor), estes, mais uma vez, foram mantidos sob agitação constante (125 rpm) por 24 horas.

Posteriormente, 2 mL da cultura foram centrifugados a uma rotação de 12000 g por 5 minutos. Ao término da centrifugação, 1,4 mL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo acrescido de 0,6 mL do reagente Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub>, 0,5M em 34% de ácido perclórico), permanecendo no escuro, a 28°C, por 30 minutos. As amostras foram avaliadas em espectrofotômetro, e as absorvâncias medidas a 530 nm. O resultado positivo foi confirmado pela formação de coloração rósea, e para a conversão das leituras foi utilizada uma curva padrão (BARBOSA, 2010), a partir de

uma solução de diferentes concentrações de AIA. O experimento foi conduzido em triplicata e o esquema estatístico caracterizado como fatorial duplo.

A produção de AIA foi classificada em diferentes níveis. De acordo com Montañez et al. (2012), considera-se como baixa produção, bactérias que sintetizam até  $50,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ , média, entre  $50,00$  e  $150,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  e, alta, bactérias que sintetizam mais que  $150,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA. Assim, a classificação foi feita com base nos testes estatísticos aplicados, sendo considerados apenas, os resultados significativos.

### **2.2.2. Influência do pH ácido e básico**

Para avaliar a influência da salinidade sobre a síntese de AIA e classificação da produção, foi seguida a mesma metodologia descrita acima. Entretanto, após o crescimento bacteriano em meio líquido TSA 10%,  $10 \mu\text{L}$  do inóculo bacteriano foram transferidos para tubos contendo meio líquido TSA 10% (5 mM de triptofano) com o pH ajustado para 4,5 (ácido) e 7,2 (básico). O experimento foi conduzido em triplicata e o esquema estatístico caracterizado como fatorial duplo.

### **2.2.3. Influência da salinidade**

Para avaliar a influência da salinidade sobre a síntese de AIA e classificação da produção, foi seguida a mesma metodologia descrita acima. Entretanto, após o crescimento bacteriano em meio líquido TSA 10%,  $10 \mu\text{L}$  do inóculo bacteriano foram transferidos para tubos contendo meio líquido TSA 10% (5 mM de triptofano) com diferentes concentrações de sal, 1% e 5% de NaCl. O experimento foi conduzido em triplicata e o esquema estatístico caracterizado como fatorial duplo.

## **2.3. Seleção de bactérias produtoras de exopolissacarídeo (EPS)**

Para avaliação qualitativa e produção de EPS, as linhagens foram cultivadas em meio TSA líquido. Após o crescimento bacteriano, foram coletados  $10 \mu\text{L}$  do inóculo e colocados sob discos estéreis de 5 mm de diâmetro. As bactérias foram cultivadas sob esses discos, em meio de cultura modificado, contendo 10% de sacarose – fonte de carbono ( $20 \text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura;  $15 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ;  $0,015 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MnSO}_4$ ;  $0,015 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ ;  $0,03 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ ;  $0,015 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl;  $15 \text{ g L}^{-1}$  de Agar), em pH 7,5, a  $28^\circ\text{C}$ , por 48 horas.

Em seguida, a caracterização qualitativa do EPS foi verificada visualmente pela presença ou ausência de halo de produção de EPS, sendo, portanto, caracterizado como positivas, as linhagens bacterianas que apresentaram halo, e negativas, bactérias que não apresentaram halo, com 48 horas após a inoculação.

Para confirmar a produção de EPS, foram coletadas, com auxílio de uma alça de platina, células bacterianas que foram colocadas em tubos contendo 2 ml de álcool etílico. A confirmação aconteceu a partir da precipitação do EPS. O teste é negativo quando o meio fica turvo (KAVAMURA, 2012).

As linhagens positivas foram classificadas de acordo com o tamanho do halo do EPS produzido, correspondendo a + para halo com pouca produção (< 10 mm de diâmetro); ++ para halo com média produção ( $\geq 10 \leq 14$  mm de diâmetro); +++ para halo com ótima produção (> 14 mm de diâmetro). Para a medição do halo foi utilizado um paquímetro digital. O experimento foi realizado em triplicata e em delineamento inteiramente casualizado.

#### **2.4. Caracterização de bactérias produtoras de moléculas *quorum sensing* (QS)**

Para a caracterização de linhagens produtoras da molécula ALHs (*N-Acyl Lactona Homoserina*), foi realizada a mesma metodologia citada no Capítulo 1, item 2.4.

#### **2.5. Estudo da diversidade bacteriana por meio da técnica de REP- PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic elements*)**

A técnica de REP-PCR utiliza elementos dispersos repetitivos de todo o genoma bacteriano, como locais iniciadores para a PCR. Assim, durante o processo são amplificadas regiões genômicas distintas localizadas entre os elementos repetitivos. Para realização desta técnica foi seguida metodologias propostas por Cavigliasso et al. (2012), Mendes et. al. (2007) e Taule et al. (2011) com algumas modificações. As análises foram preparadas em reações independentes contendo os *primers* BOX - 1 AR e ERIC 1 e ERIC 2.

Para as reações utilizando o *primer* BOX - 1AR (5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3'), foi feita, inicialmente, a repicagem das linhagens bacterianas em meio sólido TSBA (16 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico; 30 g L<sup>-1</sup>

de TSB). Após o cultivo, as reações foram preparadas, a partir de colônias bacterianas isoladas, em um volume final de 25 $\mu$ L, contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde, 10 $\mu$ M do *primer*, 25 mM de cada dNTP, 10 mg mL<sup>-1</sup> de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 100% de DMSO (dimetilsufoxamida), 5X Gitschier buffer (1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1M Tris-HCL pH 8,8; 1M MgCl<sub>2</sub>; 0,5M EDTA pH 8,8; 14,4M  $\beta$ -mercaptoethanol), 5U  $\mu$ L<sup>-1</sup> de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems) programado para realizar uma desnaturação inicial 95°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 3 segundos, 92°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 min e extensão do *primer* a 65°C por 8 min, seguida de extensão final a 65°C por 8 min. Após a amplificação, a reação foi avaliada em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão TAE 1x (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA), corado com Gel Red (Biotium) e 10X Loading Buffer (Invitrogen), observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

A segunda reação utilizando os *primers* ERIC 1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTC-3') e ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAG-3'), foi realizada para um volume final de 25 $\mu$ L, contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde, 100  $\mu$ M de cada *primer*, 2,5 mM de cada dNTP, 10X tampão da enzima, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5U  $\mu$ L<sup>-1</sup> Taq DNA Polimerase (HOT FIREPol) e água ultrapura.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 52°C por 1 min, e extensão do *primer* a 65°C por 8 min seguida de extensão final a 65°C por 16 min. Após a amplificação, a reação foi avaliada em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão TAE 1x, corado com Blue Green (LGC Bio), observado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

Os perfis de bandas observados foram transformados em planilha binária e, em seguida, utilizados para obter um dendograma de similaridade calculado através do coeficiente de Jaccard e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), utilizando o software PAST versão 1.9 (OLIVEIRA, 2012).

## **2.6. Identificação das linhagens bacterianas a partir do sequenciamento parcial do 16s rDNA**

As linhagens bacterianas que foram, anteriormente, submetidas ao sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, em laboratório especializados, tiveram a qualidade das sequências conferida utilizando o *software* FinchTV, versão 1.4.0 (Geospiza Inc) e as sequências de cada oligonucleotídeo iniciador foram unidas utilizando o *software* BioEdit, versão 7.1.3.0. Por fim, as sequências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), disponível no website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

## **2.7. Testes de germinação em sementes de milho inoculadas com BPCV**

Para o teste de inoculação, foram selecionadas onze linhagens bacterianas, com base nos dados de promoção de crescimento vegetal obtidos nesta pesquisa, e, a inoculação realizada em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José).

Os inoculos bacterianos foram obtidos a partir de colônias isoladas, repicadas em meio TSA líquido. Após o crescimento bacteriano, as culturas bacterianas foram diluídas em solução tampão PBS (8 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,2 g L<sup>-1</sup> de KCl; 1,44 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) e a densidade ótica dos isolados foram verificadas em espectrofotômetro (630 nm) de forma a atingir densidade óptica aproximada de 0,095 (LIMA, 2012). As sementes permaneceram imersas nessa solução por 30 minutos sob agitação. Passado esse tempo, em experimentos independentes, as sementes inoculadas foram semeadas em papel tipo Germitest, umedecidos 2,5 vezes o seu peso com água destilada na forma de rolo e depois mantida em germinador, a temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias (OLIVEIRA, 2012). Os tratamentos foram dispostos de forma casualizada, caracterizando o delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, 3 repetições e amostragem de 25 sementes por cada repetição, totalizando 900 unidades experimentais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Descrição dos tratamentos de inoculação bacteriana em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José).

Tratamento	Isolado Bacteriano	Tratamento	Isolado Bacteriano
1	Controle*	7	UAGC125 - <i>B. cepacia</i>
2	G1 - <i>B. gladioli</i>	8	UAGC130 - <i>B. cepacia</i>
3	G28 - <i>B. heleaia</i>	9	UAGC348- <i>B. graminis</i>
4	G29 - <i>B. gladioli</i>	10	UAGC723- <i>B. gladioli</i>
5	UAGC78 - <i>B. cepacia</i>	11	UAGC867 - <i>Burkholderia</i> sp.
6	UAGC114 - <i>B. cepacia</i>	12	UAGC871 - <i>Burkholderia</i> sp.

\*Controle= ausência de isolado bacteriano

Para avaliação da promoção do crescimento vegetal em plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José) inoculadas com diferentes linhagens bacterianas, foram avaliadas as seguintes variáveis, de acordo com a regra de análise de sementes – RAS (MAPA, 2009): primeira contagem de germinação (correspondente a primeira contagem de sementes germinadas após a semeadura), o índice de velocidade de germinação (IVG) proposto por Maguire (1962); comprimento total (cm), comprimento da parte aérea e radícula (cm); fitomassa total fresca e seca (g).

## 2.8. Análise estatística

Os resultados da quantificação do ácido indol acético (AIA), produção de exopolissacarídeos (EPS) e das análises dos testes de promoção em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José) foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5%, através do *software* Sisvar, versão 5.3.

Os dados de frequência relativa foram submetidos ao teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para confirmar a influência dos fatores, sobre a distribuição dos isolados produtores de QS e EPS.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Produção de ácido indol acético (AIA) sob a presença e ausência de L-triptofano

Quanto à produção de AIA, 100% das linhagens avaliadas foram positivas ao teste, sob a presença e/ou ausência do precursor L-triptofano, ou seja, apresentaram coloração rósea, e foram capazes de utilizar rotas metabólicas diferentes para a síntese deste fitohormônio.

Os resultados diferiram bastante quanto à produção de AIA em relação à presença ou ausência de triptofano no meio de cultura. As bactérias UAGC723 e UAGC867, na presença de L-triptofano, foram estatisticamente superiores as demais linhagens bacterianas, produzindo 226,71 e 205,54  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Na ausência do precursor, as linhagens não diferiram estatisticamente entre si, sendo que a produção foi de 2,70 a 36,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 4).

Diversos trabalhos têm demonstrado o potencial de BPCV em sintetizar fitohormônios, como Jiang et al. (2008) que ao testar uma estirpe bacteriana pertencente ao gênero *Burkholderia*, verificaram diferentes mecanismos de promoção, como produção de sideróforos, solubilização de fosfato e produção de ácido indol acético, cuja síntese alcançou apenas 3,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , na presença de L-triptofano. Ahmed et al. (2014) salientam que o L-triptofano desempenha papel importante na modulação dos níveis de biossíntese de AIA, conseqüentemente, sua presença nos meios de cultura aumenta a produção desse fitohormônio pela maioria das BPCV.

Ao se comparar a produção de AIA sob presença e/ou ausência de L-triptofano, as linhagens G1, G28, UAGC114, UAGC125, UAGC127, UAGC723, UAGC78, UAGC867 e UAGC942 foram estatisticamente superiores à produção do fitormônio na presença de L-triptofano, isso indica que essas linhagens, utilizaram a via dependente deste aminoácido para sintetizar AIA, não havendo diferença significativa para as demais linhagens bacterianas avaliadas (Tabela 4). Andrade et al. (2014) obtiveram resultados semelhantes, ao isolar 40 bactérias de raízes de bananeira, viram que os isolados apresentaram pelo menos um aspecto positivo quanto ao potencial biotecnológico; em relação a síntese de AIA, 40% dos isolados foram capazes de produzir este fitohormônio, sendo que o isolado EB40 (*Bacillus* sp.) produziu maior

quantidade de AIA na presença do precursor ( $47,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do que na ausência de triptofano.

**Tabela 4.** Produção de ácido indol acético (AIA) sob a presença e ausência de L-triptofano, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Linhagem Bacteriana	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*		Linhagem Bacteriana	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*	
	----- L-Triptofano -----			----- L-Triptofano -----	
	Presença	Ausência		Presença	Ausência
UAGC76	17,11 Da	4,64 Aa	UAGC745	23,14 Da	16,07 Aa
UAGC78	<b>110,44 Ba</b>	<b>2,70 Ab</b>	UAGC857	20,47 Da	11,63 Aa
UAGC114	<b>49,97 Ca</b>	<b>7,58 Ab</b>	UAGC867	<b>205,54 Aa</b>	<b>14,00 Ab</b>
UAGC125	<b>49,45 Ca</b>	<b>9,56 Ab</b>	UAGC871	22,67 Da	16,42 Aa
UAGC127	<b>64,76 Ca</b>	<b>8,91 Ab</b>	UAGC904	16,55 Da	7,14 Aa
UAGC130	35,13 Ca	36,47 Aa	UAGC913	36,47 Ca	10,59 Aa
UAGC131	46,13 Ca	16,42 Aa	UAGC942	<b>71,91 Ca</b>	<b>17,11 Ab</b>
UAGC105	21,42 Da	7,49 Aa	G1	<b>105,74 Ba</b>	<b>5,55 Ab</b>
UAGC348	39,15 Ca	5,20 Aa	G2	13,57 Da	4,77 Aa
UAGC723	<b>226,71 Aa</b>	<b>30,39 Ab</b>	G10	35,35 Ca	8,52 Aa
UAGC739	<b>117,12 Ba</b>	<b>4,94 Ab</b>	G28	<b>50,66 Ca</b>	<b>2,70 Ab</b>
UAGC740	15,12 Da	6,58 Aa	G29	5,07 Da	6,54 Aa
UAGC741	14,65 Da	6,45 Aa	G83	17,49 Da	4,38 Aa

CV (%) = 45,35

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna e letras iguais minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

De acordo com a classificação da produção de AIA, na presença de L-triptofano, observa-se que o nicho endofítico de raiz apresentou 19,23% dos isolados bacterianos, com alta e média produção, percentual superior, ao observado nos demais nichos, que obtiveram apenas 3,85% dos isolados com média produção. Em todos os nichos, é observado elevado percentual de isolados bacterianos com baixa produção de AIA. Esses resultados diferem dos encontrados por Ferrara et al. (2012) que ao isolarem cepas bacterianas associadas a plantas de cana-de-açúcar, viram que não houve diferença entre os nichos de colonização, em relação à produção de AIA.



### 3.2. Produção de AIA sob influência de pH ácido e básico

Todas as linhagens avaliadas foram capazes de produzir AIA sob a influência de pH ácido (4,5) e básico (7,2), ou seja, apresentaram coloração rósea.

A linhagem bacteriana UAGC723, endofítica de raiz, sob as duas condições de pH (4,5 e 7,2), foi superior estatisticamente em relação as demais linhagens, produzindo 172,59  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 223,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 5).

Ao se avaliar a influência do pH sobre a síntese de AIA, as linhagens pertencentes ao rizoplano, UAGC125 e UAGC131, produziram mais AIA em pH ácido do que em pH básico, cujo valores foram de 93,75 e 87,88  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 5). Contrariamente, as linhagens endofíticas de raiz, UAGC78, UAGC348 e UAGC723, sintetizaram maior quantidade de AIA em pH básico (7,2), com produção variando entre 92,54 a 223,48  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ficando nítida a influência do pH ácido sob a biossíntese de AIA (Tabela 5).

**Tabela 5.** Produção de ácido indol acético (AIA) sob pH ácido (4,5) e pH básico (7,2), em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Linhagem Bacteriana	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*		Linhagem Bacteriana	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*	
	----- pH ----- 4,5	----- pH ----- 7,2		----- pH ----- 4,5	----- pH ----- 7,2
UAGC 76	23,92 Ca	19,44 Ca	UAGC 745	28,62 Ca	40,27 Ca
UAGC 78	<b>15,94 Cb</b>	<b>92,54 Ba</b>	UAGC 857	22,67 Ca	29,87 Ca
UAGC 114	17,54 Ca	24,22 Ca	UAGC 867	40,70 Ca	45,05 Ca
UAGC 125	<b>93,75 Ba</b>	<b>35,35 Cb</b>	UAGC 871	91,76 Ba	82,36 Ca
UAGC 127	57,52 Ca	46,52 Ca	UAGC 904	25,56 Ca	33,02 Ca
UAGC 130	32,37 Ca	28,19 Ca	UAGC 913	19,05 Ca	24,61 Ca
UAGC 131	<b>87,88 Ba</b>	<b>31,55 Cb</b>	UAGC 942	14,48 Ca	45,36 Ca
UAGC 105	68,26 Ba	37,38 Ca	G1	4,34 Ca	3,43 Ca
UAGC 348	<b>65,19 Bb</b>	<b>133,64 Ba</b>	G2	51,83 Ca	30,05 Ca
UAGC 723	<b>172,59 Ab</b>	<b>223,48 Aa</b>	G10	13,27 Ca	22,84 Ca
UAGC 739	24,05 Ca	58,98 Ca	G28	79,17 Ba	107,25 Ba
UAGC 740	13,40 Ca	28,75 Ca	G29	3,56 Ca	31,90 Ca
UAGC 741	25,13 Ca	37,38 Ca	G83	27,46 Ca	31,64 Ca
CV (%) = 49,08					

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna e letras iguais minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Jasim et al. (2014) ao testarem diferentes gêneros de bactérias, inclusive *Burkholderia*, quanto a capacidade de sintetizar AIA, sob diferentes condições adversas, verificaram que a produção foi maior em pH ácido (4,0) do que em de pH básico (7,0), chegando os valores a alcançar  $71,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Pereira & Castro (2014) ressaltam que as bactérias endofíticas por terem uma relação mais próxima com a planta hospedeira, sofrem menos restrições e desfrutam de uma maior proteção, quando comparadas às bactérias que colonizam outros nichos, como as do rizoplano e da rizosfera, essas condições fazem com que as bactérias endofíticas sejam mais sensíveis a estresses abióticos.

De acordo com a classificação da produção de AIA, em pH ácido (4,5), observa-se que, mais uma vez, o nicho endofítico de raiz apresentou elevado percentual de linhagens com alta e média produção (11,54%), seguido do rizoplano, com 15,38% das bactérias com média produção; os nichos endofítico de colmo e rizosfera alcançaram resultados inferiores, 3,85%. Resultados semelhantes foram observados em pH básico (7,2), cujo nicho endofítico de raiz, obteve maior percentagem de linhagens com alta e média produção (19,23%), seguido do nicho da rizosfera, com 3,85% das bactérias com média produção; os nichos endofítico de colmo e do rizoplano não apresentaram nenhuma linhagem com média e/ou alta produção. Em todos os nichos, em ambos os pH, é observado elevado percentual de isolados bacterianos com baixa produção de AIA.

### **3.3. Produção de ácido indol acético (AIA) sob influência da salinidade**

Todas as linhagens avaliadas produziram AIA em meio de cultura com 1% e 5% de NaCl, ou seja, apresentaram coloração rósea.

As linhagens UAGC723, UAGC871 e G28 expressaram maior capacidade de sintetizar AIA sob menor concentração de NaCl (1%), sendo superiores estatisticamente as demais bactérias, com produção de 181,21; 176,12 e 173,84  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, na presença de 5% de NaCl, não foi verificada diferença significativa, ou seja, a maior concentração de sal interferiu na expressão da produção de AIA, reduzindo a mesma, apesar das bactérias continuarem a produzir este fitormônio. Esta influência na redução da produção de AIA também foi observada nas

linhagens UAGC348, UAGC739, UAGC78, UAGC857 e UAGC867, cuja produção não passou de 20,21  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabela 6).

**Tabela 6.** Produção de ácido indol acético (AIA) sob diferente concentrações de NaCl, 1% e 5%, em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , por linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Linhagem Bacteriana	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*		Linhagem Bacteriana	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*	
	----- NaCl ----- 1 %	----- NaCl ----- 5 %		----- NaCl ----- 1 %	----- NaCl ----- 5 %
UAGC 76	13,61 Da	2,31 Aa	UAGC 745	26,29 Da	2,53 Aa
UAGC 78	<b>62,13 Da</b>	<b>2,44 Ab</b>	UAGC 857	<b>80,03 Ca</b>	<b>2,87 Ab</b>
UAGC 114	16,98 Da	2,57 Aa	UAGC 867	<b>94,22 Ca</b>	<b>13,31 Ab</b>
UAGC 125	21,12 Da	2,36 Aa	UAGC 871	<b>176,12 Aa</b>	<b>12,71 Ab</b>
UAGC 127	23,32 Da	2,49 Aa	UAGC 904	23,45 Da	2,62 Aa
UAGC 130	12,02 Da	2,14 Aa	UAGC 913	13,61 Da	2,53 Aa
UAGC 131	13,10 Da	3,26 Aa	UAGC 942	14,00 Da	2,57 Aa
UAGC 105	16,93 Da	2,57 Aa	G2	27,93 Da	2,44 Aa
UAGC 348	<b>116,09 Ba</b>	<b>9,90 Ab</b>	G10	8,22 Da	8,22 Aa
UAGC 723	<b>181,21 Aa</b>	<b>13,31 Ab</b>	G28	<b>173,84 Aa</b>	<b>20,21 Ab</b>
UAGC 739	<b>114,97 Ba</b>	<b>5,42 Ab</b>	G83	6,76 Da	2,70 Aa
UAGC 740	9,52 Da	2,74 Aa	G1	30,25 Da	3,59 Aa
UAGC 741	12,36 Da	2,49 Aa	G29	31,11 Da	5,78 Aa

CV(%) = 42.42

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna e letras iguais minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

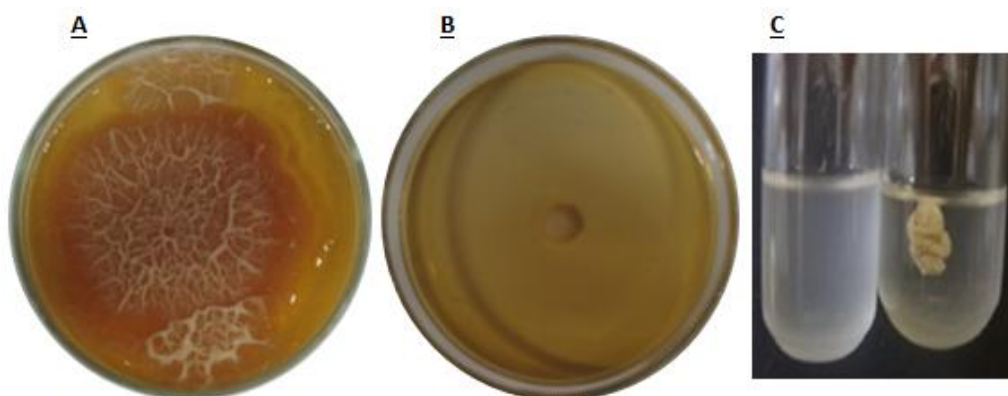
Pereira et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes ao isolar e avaliar linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*, quanto a produção de AIA, sob a presença de L-triptofano e estresse salino, verificaram que as maiores concentrações de NaCl (2,5% e 5,0%) reduziram a produção deste fitohormônio, de maneira que a síntese de AIA não passou de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (na concentração de 10% de NaCl) e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (na concentração de 5% de NaCl). Entretanto, Rojas-Tapías et al. (2014) alcançaram resultados diferentes, quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal sob condições salinas, verificaram que a linhagem C5 sintetizou AIA apenas sob a presença de NaCl, sendo negativa ao teste na ausência de estresse.

Sabe-se que a produção de AIA por BPCV pode auxiliar o desenvolvimento das plantas, porém, condições adversas podem interferir nesta produção, como foi observado nesses experimentos.

De acordo com a classificação da produção de AIA, na presença de 1% de NaCl, observa-se que, mais uma vez, o nicho endofítico de raiz apresentou elevado percentual de linhagens com alta e média produção (23,08%), seguido da rizosfera e endofítico de colmo, com 3,85%; o nicho do rizoplano não obteve nenhuma linhagem com média e/ou alta produção. Em todos os nichos, é observado elevado percentual de isolados bacterianos com baixa produção de AIA.

### 3.4. Produção de exopolissacarídeo (EPS)

A metodologia utilizada foi eficaz na caracterização da capacidade das bactérias do gênero *Burkholderia* em produzirem EPS *in vitro* (Figura 1).



**Figura 1.** Bactéria positiva (A); Bactéria negativa (B); Confirmação da produção de EPS - negativo: turvo/ tubo da esquerda; positivo: precipitado/tubo da direita - (C).

A tabela 7 demonstra que 38,46% das linhagens tiveram alta produção, 19,23% média produção e apenas 3,85% pouca produção de EPS. Esses resultados diferem aos encontrados por Upadhyay et al. (2011), que ao isolarem 242 bactérias de áreas com e sem estresse salino, alcançaram uma taxa alta de linhagens bacterianas negativas ao teste de EPS, de 58 isolados testados apenas onze expressaram potencial de produção de EPS, sendo a frequência relativa de isolados negativos ao teste de 81,00%.

**Tabela 7.** Frequência relativa (%) da produção do halo de EPS, 48 horas após a inoculação, de acordo com a classificação do tamanho do halo (mm) por linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

<b>Classificação do tamanho do halo de EPS</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>	<b>Linhagens bacterianas</b>
Negativo	38,46	UAGC78, UAGC125, UAGC127, UAGF723, UAGC857, UAGC871, UAGC904, UAGC867, G2 e G83
Pouca (<10 mm de diâmetro)	3,85	UAGC131
Média ( $\geq 10 \leq 14$ mm de diâmetro)	19,23	UAGC76, UAGC114, UAGC745, UAGC913 e UAGC942
Alta (>14 mm de diâmetro)	38,46	UAGC348, UAGC739, UAGC740, UAGC741, G28, G1, G10, G29, UAGC105 e UAGC130

Qurashi et al. (2012) ressaltam que na maioria das vezes, a obtenção de ótima produção de EPS por bactérias, está correlacionada ao ambiente estressante do qual esses micro-organismos foram isolados, devido a essa condição, as bactérias expressam, de forma mais acentuada, com o intuito de fornecer uma maior proteção a planta. Isso pode justificar o fato, das bactérias avaliadas, apresentarem uma menor porcentagem de ótima produção de EPS, visto que, elas foram isoladas e cultivadas sob condições não estressantes.

Considerando-se a medição dos halos de produção de EPS (Tabela 8), foi observado que houve diferença significativa entre as linhagens bacterianas avaliadas quanto ao tamanho do halo de EPS. As bactérias UAGC 348, G29 e G1 foram estatisticamente superiores às demais, apresentando halo de 45,85; 52,77 e 54,07 mm, respectivamente. A menor produção de EPS foi da linhagem UAGC131, cujo halo de produção foi de 3,86 mm. Silva (2014) obteve resultados diferentes, ao isolar e testar bactérias tolerantes ao estresse salino, quanto aos mecanismos de promoção, verificou que todas as bactérias avaliadas foram capazes de produzir EPS, sendo que o halo de produção variou de 7,46 a 60,33 mm.

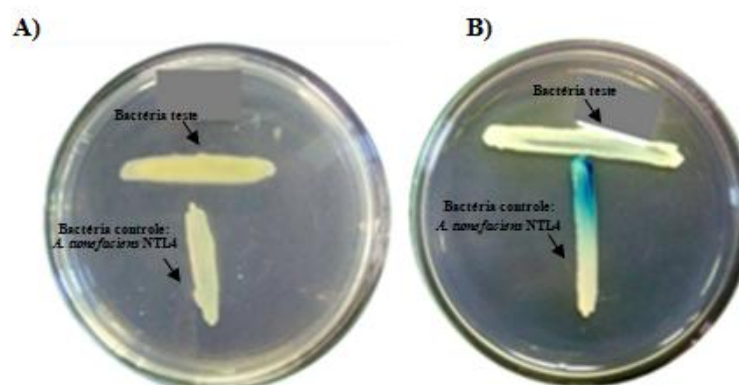
**Tabela 8.** Halo produção de Exopolissacarídeo (EPS), 48 horas após a inoculação, por linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Linhagem Bacteriana	Halo de produção de EPS (mm)*	Linhagem Bacteriana	Halo de produção de EPS (mm)*
UAGC 76	13,67 d	UAGC 745	11,77 d
UAGC 78	0,00 e	UAGC 857	0,00 e
UAGC 114	10,83 d	UAGC 871	0,00 e
UAGC 125	0,00 e	UAGC 904	0,00 e
UAGC 127	0,00 e	UAGC 913	12,42 d
UAGC 130	39,63 b	UAGC 942	10,47 d
UAGC 131	3,86 e	UAGC 867	0,00 e
UAGC 105	20,05 d	G2	0,00 e
UAGC 348	<b>45,85 a</b>	G10	27,01 c
UAGC 723	0,00 e	G28	22,31 d
UAGC 739	19,71 d	G29	<b>52,77 a</b>
UAGC 740	14,49 d	G83	0,00 e
UAGC 741	19,52 d	G1	<b>54,07 a</b>
CV (%) = 37.45			

\*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.5. Bactérias produtoras da molécula *quorum sensing* (QS)

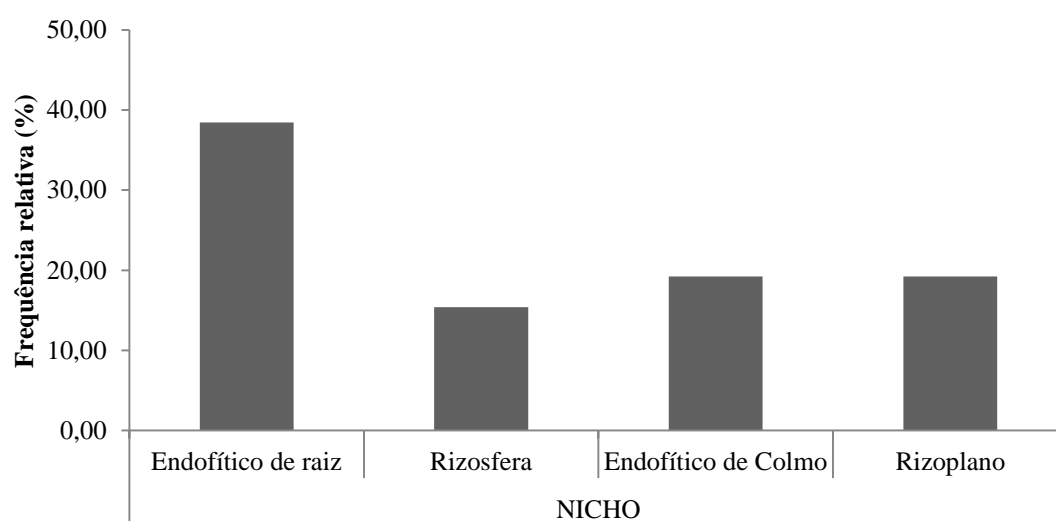
A produção de AHL (N-Acila Lactona Homoserina) foi constatada em 92,30% das linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Apenas as linhagens G28 (endofítica de raiz) e UAGC131 (rizoplano) foram negativas ao teste (Figura 2).



**Figura 2.** Caracterização da produção da molécula *Quorum sensing* visualizada através da mudança de coloração da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, inoculada de forma vertical. Onde A) caracteriza o teste como negativo – ausência de

coloração azulada da *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 e, B) caracteriza o teste como positivo – presença de coloração azulada da *Agrobacterium tumefaciens* NTL4.

Considerando a produção de QS, o teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) revelou diferença significativa, em relação ao nicho do qual as linhagens foram isoladas. Observam-se, mais uma vez, que houve maior distribuição de isolados produtores de QS no nicho endofítico de raiz (38,46%) - Figura 3.



**Figura 3.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras da molécula QS, pertencentes ao gênero *Burkholderia*, em relação ao nicho de colonização. O teste do qui quadrado ( $\chi^2$ ) revelou haver diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Correlacionando os resultados obtidos com os disponíveis na literatura verificam-se percentual de bactérias produtoras de QS inferior aos encontrados nesse estudo. Podendo citar o trabalho realizado por Leite et al. (2014) que estudando bactérias halotolerantes associadas à cana-de-açúcar e analisando a produção de QS, entre 102 isolados testados, obteve apenas 49% positivos para essa característica.

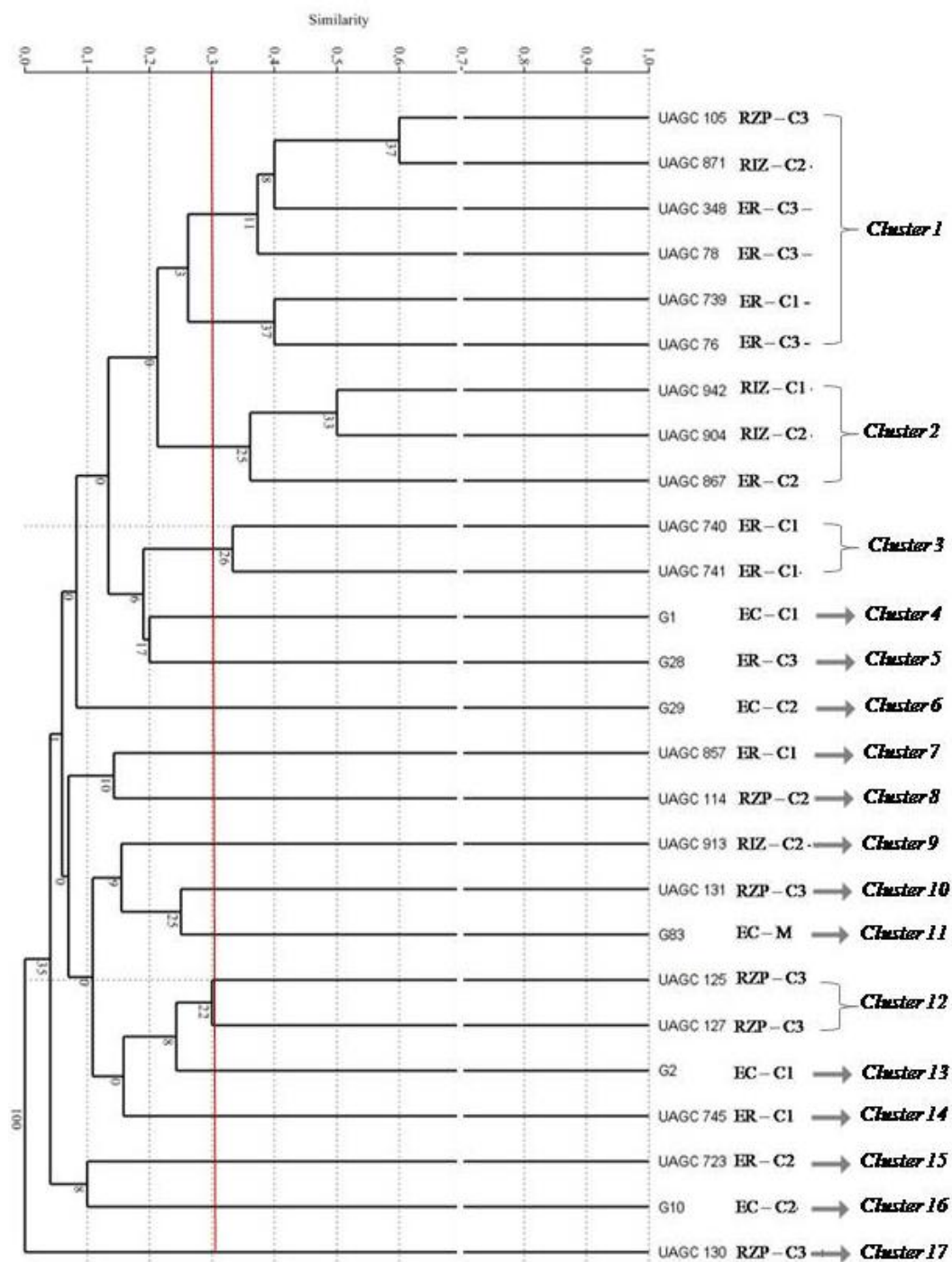
Especificamente em relação à produção de QS por bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia*, Poonguzhali et al. (2007) ressaltam a versatilidade desses micro-organismos e a diversidade de nichos que eles podem colonizar, sendo de extrema importância o estudo da produção e do mecanismo QS por essas bactérias, devido ao fato das mesmas desempenharem papel relevante no controle de fitopatógenos e na





açúcar, são semelhantes entre si. Diferentemente dos *clusters 3 e 12*, que confirmou os resultados esperados, pois bactérias isoladas do mesmo nicho e variedade, apresentam alta similaridade genética (Figura 5).

Esses resultados diferem dos encontrados por Cordero et al. (2012), que ao utilizarem a técnica de REP-PCR para estudo da diversidade genética de microorganismos, detectaram a presença de apenas 4 *clusters*, a 30% de similaridade, evidenciando baixa diversidade genética entre os microorganismos avaliados. Munday et al. (2013) salientam que o uso da técnica de REP PCR é eficiente para detectar pequenas alterações no genoma bacteriano, sendo possível diferenciar estirpes da mesma espécie, através da amplificação de fragmentos de tamanho e número específicos para cada estirpe bacteriana.



**Figura 5.** Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética de 26 linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Os números de nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 10000 repetições. ER= Endofítica de raiz; EC= Endofítica de colmo; RIZ= Rizosfera; RZP= Rizoplano; C1=

Cana-de-açúcar – Variedade RB92579; C2= Cana-de-açúcar – Variedade RB867515; C3= Cana-de-açúcar – Variedade RB863129; M= Mandioca.

### 3.7. Identificação das linhagens bacterianas

A identificação revelou a presença de diferentes espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia*, como *B. graminis*, *B. gladioli* e *B. helea*, espécies comumente encontradas nos estudos de promoção de crescimento vegetal. A similaridade de cada isolado bacteriano com a espécie encontrada pelo BLAST contra a base de dados do NCBI encontra-se na tabela 7.

**Tabela 7.** Identificação genética dos isolados bacterianos associados à cana-de-açúcar obtida pelo BLAST contra a base de dados do NCBI.

Isolado Bacteriano	Descrição	Similaridade	Nº de acesso
UAGC723	<i>Burkholderia ambifaria</i>	100%	NR_074687.1
UAGC741	<i>Burkholderia gladioli</i>	99%	NR_029213.2
UAGC348	<i>Burkholderia graminis</i>	98%	NR_116141.1
UAGC745	<i>Burkholderia anthina</i>	99%	NR_102847.1
UAGC740	<i>Burkholderia gladioli</i>	99%	NR_113629.1
UAGC114	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%	NR_074687.1
UAGC127	<i>Burkholderia anthina</i>	99%	NR_074686.1
UAGC125	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%	NR_042636.1
UAGC78	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%	NR_113645.1
UAGC76	<i>Burkholderia anthina</i>	99%	NR_104975.1
UAGC105	<i>Burkholderia anthina</i>	99%	NR_024882.1
UAGC130	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%	NR_113629.1
UAGC131	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%	NR_102847.1
G1	<i>Burkholderia gladioli</i>	98%	NR_102847.1
G2	<i>Burkholderia gladioli</i>	99%	NR_113629.1
G29	<i>Burkholderia gladioli</i>	99%	NR_113629.1
G83	<i>Burkholderia phenoliruptrix</i>	100%	NR_102849.1
G10	<i>Burkholderia gladioli</i>	99%	NR_113629.1
G28	<i>Burkholderia helea</i>	99%	NR_113025.1

Mendes et al. (2007), ressaltam que espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia*, têm recebido atenção especial, devido aos diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal que elas possuem, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, síntese de fitormônios, dentre outros. Além disso, muitos trabalhos evidenciam o potencial desses micro-organismos como produto

biotecnológico em diferentes culturas agrícolas, como em cana-de-açúcar (OMARJEE et al., 2008), arroz (ARAÚJO et al., 2013) e milho (YOUNG et al., 2013).

### 3.8. Inoculação bacteriana em sementes de milho

A inoculação bacteriana não afetou o índice de velocidade de germinação (IVG) e a primeira contagem de sementes germinadas (PC). No entanto, houve diferença significativa da inoculação nas demais análises estudadas (Tabela 8).

Em relação aos resultados de comprimento de radícula, parte aérea e total, observou-se que os tratamentos com inoculação bacteriana T2 (G1 – *B. gladioli*), T3(G28 – *B. heleia*) e T5 (UAGC78 – *B. cepacia*) proporcionaram maiores comprimentos de radícula, com valores de 14,30; 14,424 e 14,324 cm, respectivamente. Já os tratamentos T10 (UAGC723 – *B. gladioli*), T11 (UAGC867 – *B. sp.*) e T12 (UAGC871 – *Burkholderia sp.*) conferiram maior crescimento da parte aérea, com valores variando entre 5,699 e 5,715 cm; e, o tratamento T12 (UAGC871– *Burkholderia sp.*) proporcionou plântulas com maior comprimento total (19,868 cm). Ressalta-se que o tratamento sem inoculação bacteriana (T1 – Controle), resultou nos menores valores de comprimento de radícula (14,186 cm), parte aérea (5,112 cm) e total (19,598 cm) - Tabela 8. Assim, verificou-se incremento da inoculação bacteriana, sob essas três características, de 1,67% (radícula), 11,79% (parte aérea) e 1,38% (total) em relação ao controle (T1 - Controle).

Resultados superiores foram obtidos por Cappellari et al. (2013), que ao testarem duas bactérias promotoras de crescimento de plantas em sementes de *Tagetes minuta*, obtiveram incremento de 70% nas análises de altura, peso fresco e peso seco das plantas. Zafar et al. (2012) ao inocular BPCV verificaram aumento significativo de 65% no comprimento da parte aérea e 74% no comprimento das raízes, quando comparado as plântulas do tratamento sem inoculação (T1-Controle). Naveed et al. (2014) também alcançaram resultados promissores com a inoculação de bactérias pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Enterobacter* em sementes de milho, ocorrendo aumento significativo de biomassa da parte aérea, massa seca de raízes, área foliar, teor de clorofila, dentre outros.

Correlacionando esses resultados com os testes de promoção de crescimento vegetal, foi observado que as linhagens bacterianas que promoveram algum incremento

sobre o crescimento das plântulas, se destacaram nos testes de produção de AIA, sob diferentes fatores abióticos, chegando à produção deste fitohormônio a  $226,71 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Santos et al. (2014) também alcançaram resultados promissores ao testar bactérias de diferentes gêneros bacterianos, quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Dentre as diversas características avaliadas, os autores viram que todas as linhagens foram capazes de produzir AIA, sendo o maior valor de produção de  $25,00 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Ao inocular as linhagens em sementes de pepino, verificaram que a bactéria pertencente ao gênero *Burkholderia* sp. promoveu aumento de 62,4% no crescimento de raiz.

Estudando os dados de fitomassa total fresca e seca, observou-se que os tratamentos T8 (UAGC130 – *B. cepacia*) e T9 (UAGC348 – *B. graminis*) proporcionaram os melhores resultados de fitomassa total fresca (1,074 e 1,076 g). Nesse mesmo sentido, os tratamentos T7 (UAGC125 - *B. cepacia*), T8 (UAGC130 - *B. cepacia*) e T9 (UAGC348 - *B. cepacia*) resultaram em maior fitomassa total seca (0,289 a 0,291 g). Mais uma vez, o tratamento sem inoculação bacteriana (T1) foi inferior estatisticamente, com produção de fitomassa total fresca e seca de 1, 049 e 0,28g, respectivamente (Tabela 8).

Ainda sobre o incremento da inoculação bacteriana sobre os dados de fitomassa total fresca e seca, observou-se que alguns tratamentos com inoculação contribuíram com 2,57% e 3,93% sobre tais características, quando comparadas ao controle. Destacam-se, mais uma vez, que essas linhagens bacterianas foram positivas para os testes de mecanismo de promoção de crescimento vegetal *in vitro*.

Naveed et al. (2014) com o objetivo de selecionar BPCV, testaram cinco estirpes bacterianas endofíticas quanto aos mecanismos e características de promoção de crescimento em plantas de milho. Os autores verificaram que todas as linhagens testadas proporcionaram aumento significativo nos dados de biomassa da planta, número de folhas, índice de área foliar e produção de grãos, incrementando em 39, 14, 20 e 42%, essas quatro características. Prévost et al. (2012) alcançaram resultados semelhantes ao inocular BPCV em sementes de milho, observaram aumento na massa seca das plantas de 20% em relação ao tratamento controle.

**Tabela 8.** Características de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas após a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal, pertencentes ao gênero *Burkholderia*, em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José).

Tratamento	Germinação		Comprimento			Fitomassa Total	
	IVG ----	PC -- (%) --	Radícula -----	Parte aérea (cm) -----	Total -----	Fresca -----	Seca (g) -----
T1 -Controle	6,16 a	98,66 a	14,186 b	5,112 d	19,598 b	1,049 f	0,280 e
T2 - G1 ( <i>B. gladioli</i> )	6,25 a	100,00 a	<b>14,300 a</b>	4,987 d	19,287 c	1,053 e	0,282 e
T3 - G28 ( <i>B. heleia</i> )	6,16 a	98,66 a	<b>14,424 a</b>	4,992 d	19,416 c	1,056 d	0,283 d
T4 - G29 ( <i>B. gladioli</i> )	6,16 a	98,66 a	14,151 b	5,041 d	19,192 c	1,060 d	0,285 c
T5 - UAGC78 ( <i>B. cepacia</i> )	6,16 a	98,66 a	<b>14,324 a</b>	5,220 c	19,544 b	1,064 c	0,286 b
T6 - UAGC114 ( <i>B. cepacia</i> )	6,16 a	98,66 a	14,057 b	5,245 c	19,303 c	1,067 c	0,288 b
T7 - UAGC125 ( <i>B. cepacia</i> )	6,25 a	100,00 a	13,897 b	5,285 c	19,183 c	1,071 b	<b>0,289 a</b>
T8 - UAGC130 ( <i>B. cepacia</i> )	6,16 a	98,66 a	13,792 c	5,427 b	19,219 c	<b>1,074 a</b>	<b>0,291 a</b>
T9 - UAGC348 ( <i>B. graminis</i> )	6,16 a	98,66 a	13,660 c	5,516 b	19,176 c	<b>1,076 a</b>	<b>0,291 a</b>
T10 - UAGC723 ( <i>B. gladioli</i> )	6,16 a	98,66 a	13,731 c	<b>5,715 a</b>	19,445 c	1,067 c	0,287 b
T11 - UAGC867 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	6,08 a	97,33 a	14,011 b	<b>5,677 a</b>	19,688 b	1,057d	0,283 d
T12 - UAGC871 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	6,25 a	100,00 a	14,169 b	<b>5,699 a</b>	<b>19,868 a</b>	1,046 f	0,279 f
CV (%)	<b>2,02</b>	<b>2,02</b>	<b>0,88</b>	<b>1,10</b>	<b>0,69</b>	<b>0,20</b>	<b>0,31</b>

\*Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. IVG = Índice de velocidade de germinação; PC = Primeira contagem de sementes.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que:

- 1- Linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram capazes de sintetizar AIA sob a presença de diferentes fatores abióticos.
- 2- A bactéria UAGC723 (*Burkholderia ambifaria*) foi a maior produtora de AIA, independente da presença de triptofano no meio de cultura, do pH ou da concentração de sal.
- 3- Bactérias associadas ao nicho endofítico de raiz expressaram capacidade maior de produção de AIA e da molécula QS, quando comparadas as linhagens pertencentes aos nichos endofítico de colmo, rizoplano e rizosfera.
- 4- Apesar de não ter sido aplicado nenhuma condição de estresse, a maioria das bactérias mostrou-se positivas quanto à produção de EPS e da molécula *quorum sensing*.
- 5- A técnica de REP-PCR permitiu observar que, apesar das linhagens bacterianas pertencerem ao mesmo gênero bacteriano, elas são diversas geneticamente entre si.
- 6- Bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* promoveram incremento sob as análises de comprimento de radícula, parte aérea e total, fitomassa total fresca e seca de plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José) em condições laboratoriais; com destaque para as linhagens UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) e UAGC348 (*Burkholderia graminis*). Sendo que, devido ao fato da linhagem UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) ser classificada como patógeno humano, não é recomendada a inoculação em condições de ambiente protegido, nem tão pouco em experimento de campo, devido a questões de biossegurança.
- 7- Apesar da linhagem UAGC723 (*Burkholderia ambifaria*) ser a maior produtora de AIA sob as diferentes condições impostas, ela não se mostrou promissora em relação à promoção de crescimento em plântulas de milho, o que demonstra que concentrações elevadas desse fitohormônio podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento inicial de plantas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESEMOYE, A., TORBERT, H., KLOPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 921-929, 2009.

AHMED, E. A.; HASSAN, E. A.; EL TOBGY, K. M. K.; RAMADAN, E. M. Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. **Annals of agricultural science**, v. 59, n. 2, p. 273-280, 2014.

ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCH, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; PEREIRA, D. F. G. S. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n.1, p. 27-34, 2014.

ANDRADE, P. A. M. **A composição da comunidade bacteriana do solo como fator determinante na micorrização de cana-de-açúcar por *Glomus clarum***. 73 p. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo/ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP/ESALQ.

ARAÚJO, A. E. S.; BALDANI, V. L. D.; GALISA, P. S.; PEREIRA, J. A. BALDANI, J. I. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 49-55, 2013.

BARBOSA, M. V. **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas em Pernambuco**. 72 p. 2010. (Monografia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE-UAG.

BARROS, M. C. S. **Bactérias endofíticas de cana-de-açúcar e mandioca: isolamento, caracterização e potencial de promoção de crescimento vegetal**. 80 p.



2010. Monografia (graduação) – Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco – UAG/UFRPE.

BHATTACHARYYA, P., JHA, D. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012.

CAPPELLARI, L. D. R.; SANTORO, M. V.; NIEVAS, F.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 16-22, 2013.

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; SANTOS, P.E.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 345, p. 155–169, 2011.

CAVIGLIASSO, P. C. A.; PRÍNCIPE, A.; GODINO, A.; JOFRÉ, A.; MORI, G.; FISCHER, S. Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from maize plants grows in a central region of Argentina. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 342-351, 2012.

CORDERO, P.; CAVIGLIASSO, A.; PRÍNCIPE, A.; GODINO, A.; JOFRÉ, E.; MORI, G.; FISCHER, S. Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from maize plants growth in a central region of Argentina. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 342-351, 2012.

COSTA, D. P. Mecanismos de interação entre bactérias endofíticas e plantas de cana-de-açúcar. 124 p. 2010. Monografia (graduação) – Unidade Acadêmica de Garanhuns/Universidade Federal Rural de Pernambuco – UAG/UFRPE.

COUTINHO, B. G.; MITTER, B.; TALBI, C.; SESSITSCH, A.; BEDMAR, E. J.; HALLIDAY, N.; JAMES, E. K.; CÁMARA, M.; VENTURIA, V. Regulon Studies and

*In Planta* Role of the BraI/R Quorum-Sensing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 14, p. 4421-4432, 2013.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B.; LISBOA, B.B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44– 52, 2012.

FERRARA, F. I. S.; OLIVEIRA, Z. M.; GONZALES, H. H. S.; FLOH, E. I. S.; BARBOSA, H. R. B. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**, v. 353, p. 409-417, 2012.

HARIPRASAD, P. VENKATESWARAN, G.; NIRANJANA, S. R. Diversity of cultivable rhizobacteria across tomato growing regions of Karnataka. **Biological Control**, v. 71, p. 9-16, 2014.

JASIM, B.; JOHN, C. J.; SHIMIL, V.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISTNAN, E. K. Studies on the factors modulating indole-3-acetic acid production in endophytic bacterial isolates from *Piper nigrum* and molecular analysis of ipdc gene. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, p. 786-799, 2014.

JIANG, C.; SHENG, X.; QIAN, M.; WANG, Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant Burkholderia sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation on metal-polluted soil. **Chemosphere**, v.72, p. 157-164, 2008.

JOSHI, S. R.; NONGKHLAW, F. M. W. Distribution pattern analysis of epiphytic bacteria on ethnomedicinal plant surfaces: A micrographical and molecular approach. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 2, p. 34 – 40, 2014.

KAVAMURA, V. N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. 2012. 246f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência, Universidade de São Paulo – ESALQ.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, 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.

LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, (Suplemento), p. S73–S79, 2014.

LIMA, D. R. M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado). 110 p. 2012. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

LIU, Y. G. Q.; LI, P. Z. X.; JI, Q.; HE, Z. ZHAO, Y.; YANG, H. ZHAO, X.; ZHANG, L. Na endophytic bacterium isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer enhances growth, reduces morbidity, and stimulates ginsenoside biosynthesis. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 132-138, 2015.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para Análise de sementes (RAS)**. Brasília, 399p. 2009.

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

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, n. 54, p. 21-28, 2012.

MUNDAY, C. I.; O'LOINGSIGH; TAPPER, N. J.; DECKKER, P. D.; ALLISON, G. E. UTILISATION OF Rep-PCR to track microbes in aerosols collected adjacent to their source, a saline lake in Victoria, Australia. **Science of the Total Environment**, v. 450-451, p. 317-325, 2013.

NAVEED, M.; MITTER, B.; REICHENAUER, T. G.; WIECZOREK, K.; SESSITSCH A. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p.30-39, 2014.

NAVEED, M.; MITTER, B.; YOUSAF, S.; PASTAR, M.; AFZAL, M.; SESSITSCH, M. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 2, p.249-26, 2014.

OLIVEIRA, J. T. C. **Caracterização fisiológica e genética de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a capim braquiária**. 130p. 2012. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Pastagem – Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns.

OLIVEIRA, G. P. **Maturação e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 99 p. 2012. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

OMARJEE, J.; BALANDREAU, J.; SPAULL, V. W.; CADETE, P. Relationships between *Burkholderia* populations and plant parasitic nematodes in sugarcane. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n.1, p. 1-14, 2008.

PEREG, L.; MCMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 80, p. 349-358, 2015.

PEREIRA, S. I. A.; CASTRO, P. M. L. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. **Ecological Engineering**, v. 73, p. 526-535, 2014.

PEREIRA, A. P. A.; SILVA, M. C. B.; OLIVEIRA, J. R. S.; RAMOS, A. P. S.; FREIRE, M. B. G. S.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 112-121, 2012.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Quorum-sensing signals produced by plant-growth promoting *Burkholderia* strains under in vitro and in planta conditions. **Research in Microbiology**, v. 158, p. 287-294, 2007.

POUPIN, M. J.; TIMMERMANN, T.; VEGA, A.; ZUÑIGA, A.; GONZÁLEZ, B. Effects of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the Life Cycle of *Arabidopsis thaliana*. **Plos one**, v. 8 n. 7, p. 1-15, 2013.

PRÉVOST, D.; GAUVIN-TRUDEL, C.; JUGE, C. Diversity of Bradyrhizobium populations associated to soybean-maize rotations in Québec, Eastern Canada, and their

potential to improve growth of both plant species. **Applied Soil Ecology**, v. 59, p. 29-38, 2012.

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, n.2, p.1183-1191, 2012.

SANTOS, A. F. J.; MARTINS, C. Y. S.; SANTOS, P. OO; CORRÊA, E. B.; BARBOSA, H. R.; SANDOVAL, A. P. S.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, J. T.; SOARES, A. C. F. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 385, n. 1-2, p. 37-48, 2014.

SILVA, F. G. **Bactérias halotolerantes associadas a plantas de *Atriplex mummularia* L. e sua inoculação em mudas.** 90p. 2014. Dissertação (Mestrado). Pós Graduação em Produção Agrícola - Universidade Federal de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns.

SUÁREZ – MORENO, Z. R., CABALLERO – MELLADO, J.; COUTINHO, B. G., MENDONÇA – PREVIATO, L.; JAMES, E. K.; VENTURI, V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. **Microbiology Ecology**, v. 63, p. 249–266, 2012.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLETT, E.W. Pyrosequence enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v.1, p. 283-290, 2007.

ROJAS-TAPÍAS, D.; MORENO-GALVÁN, A.; PARDO-DÍAZ, S.; OBANDO, M.; RIVERA, D.; BONILLA, R. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 264-272, 2012.

TALBI, C.; DELGADO, M. J.; GIRARD, L.; RAMIREZ-TRUJILLO, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; BEDMAR, E. J. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p. 4587–4591, 2010.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F.; The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**. 347:1-400, 2011.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, J. S.; SINGH, D. P. Exopolysaccharide Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. **Pedosphere**, v. 21, n. 2, p. 214-222, 2011.

YOUNG, L. S.; HAMEED, A.; PENG, S. Y.; SHAN, Y. H.; WU, S. P. Endophytic establishment of the soil isolate *Burkholderia* sp. CC-A174 enhances growth and P-utilization rate in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 66, p. 40-47, 2013.

ZAFAR, M.; ABBASI, M. K.; KHAN, M. A.; KHALIQ, A.; SULTAN, T.; ASLAM, M. Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Growth, Nodulation and Nutrient Accumulation of Lentil Under Controlled Conditions. **Pedosphere**, v. 22,, n. 6, p. 848-859, 2012.

**ANEXO**





UAGC 745 ( <i>Burkholderia anthina</i> )	ER	CA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UAGC 857 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	ER	CA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
UAGC 871 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	RIZ	CA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
UAGC 904 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	RIZ	CA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
UAGC 913 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	RIZ	CA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UAGC 942 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	RIZ	CA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UAGC 867 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	ER	CA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
G2 ( <i>Burkholderia gladioli</i> )	EC	CA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
G10 ( <i>Burkholderia gladioli</i> )	EC	CA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G28 ( <i>Burkholderia heleaia</i> )	ER	CA	+	+	+	+	+	+	+	+	-
G29 ( <i>Burkholderia gladioli</i> )	EC	CA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G83 ( <i>Burkholderia phenoliruptrix</i> )	EC	MA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
G1 ( <i>Burkholderia gladioli</i> )	EC	CA	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ER: Endofítica de raiz; RZP: Rizoplano; RIZ: Rizosfera; EC: Endofítica de colmo; CA: Cana-de-açúcar; MA: Mandioca; + : Positiva para a característica avaliada; - : Negativa para característica avaliada; AIA CT: Produção de ácido indol acético na presença de L-triptofano; AIA ST: Produção de ácido indol acético na ausência de L-triptofano; EPS: Produção de exopolissacarídeos; QS: Produção de *quorum sensing*.

---

**CAPÍTULO III**

**EFEITOS DO ESTRESSE SALINO SOB O CRESCIMENTO INICIAL DE  
PLÂNTULAS DE MILHO (*Zea mays*) INOCULADAS COM BACTÉRIAS  
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

---

## RESUMO

Vários são os estresses que causam reduções na produtividade das culturas agrícolas, mas a salinização dos solos configura em um dos estresses ambientais mais devastadores, que resultam em grandes perdas de áreas cultivadas, produção e qualidade das culturas. As BPCV quando associadas às plantas, podem exercer efeitos benéficos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios e sideróforos, síntese de exopolissacarídeos e transformação de nutrientes quando aplicadas às sementes ou incorporadas no solo, inclusive sob condições adversas. Assim, o objetivo através deste trabalho, foi analisar o desempenho de BPCV, em contornar os efeitos de diferentes concentrações de NaCl, sob o crescimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José). Para tanto, quatro linhagens bacterianas promotoras de crescimento vegetal foram cultivadas e inoculadas sob a ausência e presença (1,0 e 2,25%) de NaCl em sementes de milho. Para a avaliação da promoção de crescimento foram realizadas análises de primeira contagem de germinação – PC; índice de velocidade de germinação (IVG); presença e/ou ausência de radícula e pêlos radiculares; comprimento total, parte aérea e radícula (cm); fitomassa total fresca e seca (g). Os resultados mostraram que a inoculação bacteriana não teve efeito sobre as análises de IVG na ausência de estresse salino; PC na concentração de 0% e 1,0% de NaCl; emissão de pêlos radiculares e comprimento total das plântulas na presença de 1,0% de NaCl; fitomassa total fresca e seca na ausência e/ou presença de NaCl. Entretanto, resultados promissores foram obtidos com a inoculação de BPCV sobre as análises de IVG na presença de estresse salino (1 e 2,25% de NaCl); emissão de radícula e pêlos radiculares sob 2,25% de NaCl; comprimento de radícula e total na ausência e presença de 2,25% de NaCl; comprimento de parte aérea na ausência de estresse salino. A inoculação com a bactéria UAGF53 reduziu os dados de PC e comprimento de radícula na presença de 2,25% de NaCl. Portanto, observou-se que as linhagens UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) e UAGC348 (*Burkholderia graminis*) demonstraram potencial para amenizar os efeitos do estresse salino sob plântulas de milho, necessitando de maior exploração em condições de campo, para confirmar os efeitos de promoção, e assim, explorar o potencial biotecnológico de tais bactérias.

Palavras-chave: cloreto de sódio; promoção de crescimento vegetal; inoculação bacteriana

## ABSTRACT

Several are stresses that cause reductions in crop yield, but soil salinization sets up in one of the most devastating environmental stresses, resulting in large losses of cultivated areas, yield and quality of crops. The BPCV when associated with plants may have beneficial effects like biological nitrogen fixation (BNF), phytohormones production and siderophores, exopolysaccharides synthesis and processing of nutrients when applied to seeds or incorporated into the soil, including under adverse conditions. The objective of this work was to analyze the performance of BPCV, in circumventing the effects of different concentrations of NaCl, under the initial growth of maize seedlings (*Zea mays* var. St. Joseph). To this end, four bacterial strains promoting plant growth were inoculated and cultured in the absence and presence (1.0 and 2.25%) NaCl in corn seeds. For the evaluation of growth promotion were performed first germination counting analysis - PC; germination speed index (GSI); presence and / or absence of radicle and root hairs; total length, shoot and radicle (cm); total fresh and dry phytomass (g). The results showed that the bacterial inoculation did not affect over IVG analysis the absence of salt stress; PC at a concentration of 0% and 1.0% NaCl; issuance of root hairs and overall length of the seedlings in the presence of 1.0% NaCl; total fresh biomass and dry in the absence and / or presence of NaCl. However, promising results were obtained by inoculation of BPCV over IVG analysis in the presence of stress (1% NaCl and 2.25); issuance of radicle and root hairs under 2.25% NaCl; radicle and complete in the absence and presence of 2.25% NaCl; shoot length the absence of salt stress. The inoculation with bacteria UAGF53 reduced PC data and radicle in the presence of 2.25% NaCl. Therefore, it is observed that the UAGC130 lineage (*Burkholderia cepacia*) and UAGC348 (*Burkholderia graminis*) have demonstrated the potential to assuage the effects of salt stress in maize seedlings, requiring further exploration in field conditions to confirm the effects of promotion, and thus explore the potential of biotechnology of such bacteria.

Keywords: sodium chloride; plant growth promotion; bacterial inoculation

## 1. INTRODUÇÃO

O início do século 21 é marcado pela escassez global de recursos hídricos, poluição ambiental e aumento da salinização dos solos e da água. O aumento da população humana e redução de áreas agricultáveis disponíveis para o cultivo agrícola são ameaças para a sustentabilidade da agricultura (SHAHBAZ & ASHRAF, 2013).

Vários são os estresses que causam reduções na produtividade das culturas agrícolas, mas a salinização dos solos configura em um dos estresses ambientais mais devastadores, que resultam em grandes perdas de áreas cultivadas, produção e qualidade das culturas (SHRIVASTAVA et al., 2014). Estima-se que 10% das áreas agrícolas mundiais e 27% das áreas irrigadas já estão sendo afetadas pela salinidade. Além de reduzir consideravelmente a atividade biológica do solo, o estresse salino também provoca efeitos deletérios às plantas como redução da taxa de crescimento e biomassa, menor altura de plantas, folhas menores, deficiência nutricional, dentre outros (ALAMRI et al., 2009).

Diferentes estratégias foram desenvolvidas a fim de diminuir os efeitos tóxicos causados pelo excesso de sais sobre o crescimento das plantas, inclusive a engenharia genética de plantas. Mas, recentemente, a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), tolerantes ao excesso de sais, tem despertado o interesse da comunidade acadêmica (SHRIVASTAVA et al., 2014).

O papel dos micro-organismos, especialmente das bactérias, em promover o crescimento das plantas, através da captação de nutrientes e do controle de fitopatogénos é bem conhecido e estabelecido. As bactérias ao colonizar diferentes nichos, podem proporcionar vantagens às plantas, através de vários mecanismos diretos e indiretos de promoção, inclusive em condições desfavoráveis (NIA et al., 2012). Especialmente as BPCV quando associada às plantas, podem exercer efeitos benéficos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios e sideróforos, síntese de exopolissacarídeos e transformação de nutrientes quando aplicadas às sementes ou incorporadas no solo (SHILEV et al., 2012).

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de selecionar isolados bacterianos tolerantes a salinidade e promotores de crescimento, para o desenvolvimento das culturas, como os de Leite et al. (2014) e Santos et al. (2012) em

cana-de-açúcar, Silva (2014) e Jha et al. (2012) em plantas halofitas (*Atriplex* e *Salicornia*). De acordo com Pereira et al.(2012), é de extrema importância o estudo de isolados bacterianos que apresentem a capacidade de colonizar os tecidos e promover o crescimento vegetal, ainda que submetidos a condições de elevadas concentrações de sais no solo. Para essa seleção, o cloreto de sódio (NaCl) tem sido largamente utilizado como indicador da tolerância de bactérias à salinidade (ABDELMOUMEN et al., 1999).

Rizobactérias promotoras de crescimento, podem aumentar o desenvolvimento vegetal, especialmente em condições limitantes, como estresses (NABTI et al., 2010). Nóbrega et al. (2004) ressaltam ainda, que estas linhagens em conjunto com a seleção de hospedeiros adaptados a condições de estresse salino, podem aumentar o desempenho da simbiose e manter a produtividade vegetal de forma sustentada mesmo em condições salinas.

Assim, diante do exposto, com este trabalho, objetivou-se analisar o desempenho de BPCV, em contornar os efeitos de diferentes concentrações de NaCl, sob o crescimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Testes de germinação em sementes de milho inoculadas com BPCV

Para o teste de inoculação, foram selecionadas quatro bactérias, UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) associada ao rizoplano, UAGC348 (*Burkholderia graminis*) endofítica de raiz, ambas isoladas da variedade RB863129 de cana-de-açúcar; UAGF16 - endofítica de raiz, associada a variedade RB92579 de cana-de-açúcar; e, UAGF53 - endofítica de raiz, associada a variedade RB867515 de cana-de-açúcar. Essa seleção ocorreu com base nos dados de promoção de crescimento vegetal em sementes de milho e sorgo forrageiro obtidos nesta pesquisa (Capítulos 1 e 2). Assim, a inoculação foi realizada em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José), as quais foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA.

Os inoculos bacterianos foram obtidos a partir de colônias bacterianas isoladas, que foram repicadas em meio TSA líquido sob três concentrações de NaCl – 0%, 1,0 % e 2,25 % (JHA et al., 2011). Após o crescimento bacteriano, as culturas bacterianas foram diluídas em solução tampão PBS (8 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,2 g L<sup>-1</sup> de KCl; 1,44 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) e a densidade ótica dos isolados foram verificadas em espectrofotômetro (630nm) de forma a atingir densidade óptica aproximada de 0,095 (LIMA, 2012). As sementes permaneceram imersas nessa solução por 30 minutos sob agitação. Passado esse tempo, em experimentos independentes, as sementes inoculadas foram semeadas em papel tipo Germitest, umedecidos 2,5 vezes o seu peso, com água destilada nas concentrações de 0%, 1,0 % e 2,25 % de NaCl, na forma de rolo e depois mantida em germinador, a temperatura de 28°C, com fotoperíodo de 12 horas, por sete dias (OLIVEIRA, 2012).

Os tratamentos foram dispostos de forma casualizada, caracterizando o esquema fatorial duplo 5x3, com 15 tratamentos, 3 repetições e amostragem de 25 sementes por cada repetição, totalizando 1125 unidades experimentais (Tabela 1).



**Tabela 1.** Descrição dos tratamentos de inoculação bacteriana em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José), sob diferentes concentrações de NaCl.

Tratamento	Linagem Bacteriana	Condição de estresse
1	Controle (Sem inoculo bacteriano)	0% de NaCl
2	Controle (Sem inoculo bacteriano)	1,0% de NaCl
3	Controle (Sem inoculo bacteriano)	2,25% de NaCl
4	UAGC130 ( <i>Burkholderia cepacia</i> )	0% de NaCl
5	UAGC130 ( <i>Burkholderia cepacia</i> )	1,0% de NaCl
6	UAGC130 ( <i>Burkholderia cepacia</i> )	2,25% de NaCl
7	UAGC348 ( <i>Burkholderia graminis</i> )	0% de NaCl
8	UAGC348 ( <i>Burkholderia graminis</i> )	1,0% de NaCl
9	UAGC348 ( <i>Burkholderia graminis</i> )	2,25% de NaCl
10	UAGF16	0% de NaCl
11	UAGF16	1,0% de NaCl
12	UAGF16	2,25% de NaCl
13	UAGF53	0% de NaCl
14	UAGF53	1,0% de NaCl
15	UAGF53	2,25% de NaCl

Para avaliação da promoção do crescimento vegetal nas sementes de milho (*Zea mays*, var. São José) inoculadas com diferentes bactérias, foram avaliadas as seguintes variáveis, de acordo com a regra de análise de sementes – RAS (MAPA, 2009): primeira contagem de germinação - PC (correspondente a primeira contagem de sementes germinadas após a semeadura); índice de velocidade de germinação (IVG) proposto por Maguire (1962); presença e /ou ausência de radícula e pêlos radiculares; comprimento total (cm), comprimento da parte aérea e radícula (cm); fitomassa total fresca e seca (g).

## 2.2. Análise estatística

Os resultados das análises do teste de promoção em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José) foram avaliados pelo teste de Scott-Knott, com probabilidade de 5%, através do *software* Sisvar, versão 5.3.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efeitos da salinidade em sementes de milho inoculadas com BPCV

Analisando os efeitos da inoculação sob cada condição de estresse aplicada, foi observado que na ausência de NaCl (0%) não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos com e sem inoculação bacteriana, em relação ao IVG. Entretanto, nas concentrações de 1,0 e 2,25% de NaCl, as sementes inoculadas com as linhagens UAGC348 (*Burkholderia graminis*) e UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) foram superiores estatisticamente aos demais tratamentos, com valores de 5,96 e 5,91, respectivamente. Nessas condições a inoculação com as bactérias UAGC348 (*Burkholderia graminis*) e UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) proporcionou rendimento de 6,38% (1,0 % de NaCl) e de 13,65% (2,25% de NaCl) sobre essa característica, quando comparada ao controle. Ressalta-se que o tratamento sem inoculação (Controle) alcançou resultados inferiores na presença de NaCl, cujos valores não passaram de 5,73 (1,0 % de NaCl) e 4,98 (2,25% de NaCl).

Estudando a influência do estresse salino sob os tratamentos, verificou-se, mais uma vez, que a inoculação com as bactérias UAGC348 (*Burkholderia graminis*) e UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) diminuiu os efeitos do estresse salino (1,0% de NaCl), sob a análise de IVG, chegando os valores a serem iguais aos resultados obtidos na ausência de NaCl – Tabela 2.

Observando o efeito da inoculação sob a ausência e/ou presença de NaCl, em relação a primeira contagem de sementes (PC), verificou-se que na ausência e na concentração de 1,0 % de NaCl, não foi possível detectar diferença significativa entre os tratamentos avaliados. Efeito negativo da inoculação foi constatada na concentração de 2,25 % de NaCl, as sementes inoculadas com a bactéria UAGF53 tiveram apenas 88,00% das sementes germinadas na PC, enquanto que, o tratamento controle alcançou 93,33% (Tabela 2).

Em relação à influência do estresse salino sob os tratamentos com e sem inoculação bacteriana, constatou-se, mais uma vez, que, as plântulas do tratamento inoculado com a bactéria UAGF53, apresentaram redução de 10,81% na PC, quando comparadas as condições de ausência e presença de 1,0% de NaCl, o que demonstra que

a inoculação com essa bactéria não foi capaz de amenizar os efeitos do estresse salino sob às plântulas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Índice de velocidade de germinação (IVG) e Primeira contagem (PC) de sementes de milho (*Zea mays*, var. São José) após a inoculação bacteriana sob a ausência (0%) e presença (1,0e 2,25%) de NaCl.

Tratamento	IVG*			PC (%)*		
	NaCl			NaCl		
	0%	1,0%	2,25%	0%	1,0%	2,25%
Controle	6,04 Aa	5,73 Ba	4,98 Bb	97,33 Aa	98,67 Aa	93,33 Aa
UAGC 130	6,23 Aa	<b>5,96 Aa</b>	<b>5,36 Ab</b>	100,0 Aa	100,0 Aa	98,67 Aa
UAGC 348	6,06 Aa	<b>5,91 Aa</b>	<b>5,46 Ab</b>	97,33 Aa	100,0 Aa	97,33 Aa
UAGF 53	6,17 Aa	5,35 Bb	4,39 Bc	98,67 Aa	98,67 Aa	88,00 Bb
UAGF 16	5,97 Aa	5,68 Ba	4,92 Bb	98,67 Aa	98,67 Aa	94,67 Aa
CV (%)	3,77			3,47		

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna e letras iguais minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Qin et al. (2014) ao inocular cepas bacterianas em *L. sinense* cultivadas sobre estresse salino, observaram redução na germinação de sementes à medida que se aumentava a concentração de NaCl, mas as sementes inoculadas com as bactérias tiveram melhor índice de velocidade de germinação do que as sementes não inoculadas. Egamberdieva et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes ao aplicar diferentes concentrações de NaCl, verificaram que as sementes de trigo inoculadas com linhagens bacterianas, produtoras de fitohormônio, conseguiram suportar melhor o excesso de sais, proporcionando melhores resultados de germinação, comprimento de raiz e fitomassa.

Andréo-Souza et al. (2010) ressalta que para as sementes germinarem é necessário que exista condições favoráveis de luz, temperatura e disponibilidade de água. Entretanto, em ambientes com alta concentração de sais, ocorre uma redução no potencial osmótico. Com a água retida na solução salina, há um aumento na concentração de sais, tornando-a cada vez menos disponível para as plantas, dificultando a absorção pelas sementes, e conseqüentemente, interferindo no processo

de germinação. Assim, as BPCV surgem como alternativa eficaz para amenizar os efeitos da salinidade sobre a germinação de sementes.

Ao se analisar o desempenho da inoculação, sob as três condições de estresse salino, em relação à emissão de radícula, observou-se que na ausência de NaCl e na presença de 1,0% de NaCl, o tratamento sem inoculação bacteriana obteve maior porcentagem de radícula, 92,00 e 44,00%, respectivamente. Porém, na maior concentração de NaCl (2,25%), fato interessante foi observado, todos os tratamentos com inoculação bacteriana proporcionaram maior porcentagem de emissão radícula, chegando os valores a alcançar 100%, enquanto que no tratamento controle esse índice foi negativo, 0% (Tabela 3).

Sobre a emissão de pêlos radiculares, sob a ausência de NaCl, mais uma vez, o tratamento sem inoculação bacteriana, foi superior estatisticamente aos demais tratamentos, com valor de 66,67%. Não houve diferença significativa entre os tratamentos sem e com inoculação, na presença de 1,0% de NaCl. Sob a concentração de 2,25% de NaCl, o tratamento com a bactéria UAGF53 proporcionou maior porcentagem de pêlos radiculares (90,67%), sendo que, no controle não houve emissão de pêlos radiculares - Tabela 3.

**Tabela 3.** Presença de radícula e pêlos radiculares em sementes de milho (*Zea mays*, var. São José) após a inoculação bacteriana sob a ausência (0%) e presença (1,0% e 2,25%) de NaCl.

Tratamento	Radícula (%) *			Pêlos radiculares (%) *		
	NaCl			NaCl		
	0%	1,0%	2,25%	0%	1,0%	2,25%
Controle	92,00 Aa	44,00 Ab	0,00 Bc	66,67 Aa	6,67 Ab	0,00 Cb
UAGC 130	1,33 Cb	0,00 Bb	<b>98,67 Aa</b>	0,00 Bb	0,00 Ab	76,00 Ba
UAGC 348	22,67 Bb	0,00 Bc	<b>100,00 Aa</b>	3,00 Bb	0,00 Ab	72,00 Ba
UAGF 53	0,00 Cb	0,00 Bb	<b>100,00 Aa</b>	0,00 Bb	0,00 Ab	<b>90,67 Aa</b>
UAGF 16	10,67 Cb	0,00 Bb	<b>100,00 Aa</b>	0,00 Bb	0,00 Ab	81,33 Ba
CV (%)	17,70			18,99		

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna e letras iguais minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Segundo Gamalero et al. (2010), a salinidade afeta negativamente o crescimento da planta, mas a colonização de BPCV pode melhorar a tolerância da planta a tal condição estressante. Mercado-Blanco & Prieto (2012) salientam que o papel e importância dos pêlos radiculares para o sistema radicular é bastante conhecido. Entretanto, essas estruturas especializadas, possuem papel relevante na interação entre bactéria/planta, assumindo função decisiva na colonização da planta por bactérias promotoras.

Em relação aos efeitos da inoculação sob cada condição de estresse aplicado, observou-se que, na ausência de NaCl, o comprimento de radícula foi maior nos tratamentos inoculados com as bactérias UAGC348 (*Burkholderia graminis*) e UAGF16, chegando a alcançar 16,76 cm, resultando em incremento de 8,96%. Na presença de 1,0% de NaCl, foi constatado efeito negativo da inoculação, com as bactérias UAGF53 e UAGF16, cuja redução chegou a ser de 27,36% no comprimento da radícula, em relação aos demais tratamentos. Sob a concentração de 2,25% de NaCl, mais uma vez, os tratamentos inoculados com as linhagens UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) e UAGC348 (*Burkholderia graminis*), proporcionaram plântulas com maior comprimento de radícula (3,27cm e 3,31cm, respectivamente), incrementando em 58,17% esta característica (Tabela 4). Ainda nesse contexto, é possível observar que o estresse salino afetou o crescimento da radícula, independentemente da inoculação bacteriana, em 69,96% (1,0% NaCl) e 83,70% (2,25% NaCl).

Resultados semelhantes foram obtidos por Uyanöz & Karaca (2011) que ao aplicarem estresse salino em sementes de feijão, inoculadas com BPCV, observaram que os tratamentos com inoculação bacteriana sofreram menos os efeitos dessas condições adversas, sendo possível obter os maiores comprimentos de raiz com a inoculação bacteriana e em concentrações maiores de sais. Ressaltando que apesar dos resultados positivos, os diferentes níveis de salinidade, influenciaram significativamente o comprimento de raiz de todas as plantas.

Os dados de comprimento de parte aérea, na ausência de NaCl, revelaram que, o tratamento com a linhagem UAGC348 (*Burkholderia graminis*) proporcionou melhores resultados, alcançando 7,14cm, aumento de 19,4%; enquanto que no tratamento sem inoculação (Controle) o comprimento foi de apenas 5,52cm. Sob a concentração de 1,0% de NaCl, apenas o tratamento Controle obteve resultados estatisticamente

superiores aos demais tratamentos. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com e sem inoculação bacteriana na presença de 2,25% de NaCl. Verificando a influência da presença de NaCl em cada tratamento, é possível constatar, mais uma vez, que o estresse aplicado reduziu o comprimento da parte aérea, de todos os tratamentos, em ambas as concentrações, sendo essa redução de 67,72% e 81,24%, na presença de 1,0 e 2,25 % de NaCl – Tabela 4.

Shukla et al. (2012), ao avaliarem o efeito da inoculação bacteriana sob condições de estresse salino, observaram que plantas inoculadas com BPCV toleram de forma mais eficiente o excesso de sais do que plantas não inoculadas. As sementes inoculadas, proporcionaram plantas com melhor crescimento da parte aérea na ausência de NaCl, do que o controle (sem inoculação). Os autores verificaram também que sob concentrações maiores de NaCl, as plantas, independente da inoculação, sofrem com os efeitos do excesso de NaCl, sendo que, os tratamentos com inoculação, conseguem suportar melhor essa condição de estresse. Coelho et al. (2014) ressaltam ainda, que o desequilíbrio nutricional causado pelo excesso de sais no ambiente decorre, sobretudo, da redução da absorção de nutrientes essenciais as plantas, devido à competição na absorção e transporte, às alterações estruturais na membrana e à inibição de várias enzimas do metabolismo, resultando em plantas com menor comprimento de raiz e parte aérea.

O comprimento total das plântulas, na ausência de NaCl, foi maior no tratamento inoculado com a linhagem UAGC348 (*Burkholderia graminis*), o qual foi superior estatisticamente aos demais tratamentos, incrementando em 11,42 % essa característica. Na presença de 1,0% de NaCl, os tratamentos inoculados com as bactérias UAGF53 e UAGF16, foram os que sentiram mais o efeito do estresse salino aplicado, alcançando resultados inferiores ao tratamento sem inoculação (Controle), cuja redução foi de 30,00%. Entretanto, na concentração de 2,25 %, os tratamentos com as linhagens UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) e UAGC348 (*Burkholderia graminis*), proporcionaram plântulas de maior comprimento, 4,45 e 4,61cm, respectivamente; aumento de 42,00% em relação ao controle. Analisando, a aplicação de estresse salino sob cada tratamento, observou-se uma diminuição considerável no comprimento total das plântulas de todos os tratamentos, chegando essa redução a ser de 69,32% (1,0 % de NaCl) e 83,00% (2,25 % de NaCl) – Tabela 4.

**Tabela 4.** Comprimento de radícula, parte aérea e total de plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José) após a inoculação bacteriana sob a ausência (0%) e presença (1,0e 2,25%) de NaCl.

Tratamento	Comprimento (cm) *								
	Radícula			Parte aérea			Total		
	NaCl			NaCl			NaCl		
	0%	1,0%	2,25%	0%	1,0%	2,25%	0%	1,0%	2,25%
<b>Controle</b>	14,42 Ca	5,50 Ab	2,00 Bc	5,52 Ca	3,04 Ab	0,87 Ac	19,94 Ca	<b>8,54 Ab</b>	2,87 Bc
<b>UAGC 130</b>	15,63 Ba	5,49 Ab	<b>3,27 Ac</b>	6,54 Ba	1,86 Bb	1,19 Ac	22,17 Ba	<b>7,35 Ab</b>	<b>4,45 Ac</b>
<b>UAGC 348</b>	<b>16,76 Aa</b>	4,93 Ab	<b>3,31 Ac</b>	<b>7,14 Aa</b>	2,13 Bb	1,29 Ac	<b>23,90 Aa</b>	<b>7,06 Ab</b>	<b>4,61 Ac</b>
<b>UAGF 53</b>	15,50 Ba	3,55 Bb	2,22 Bc	5,57 Ca	1,37 Bb	1,18 Ab	21,07 Ca	4,93 Bb	3,40 Bc
<b>UAGF 16</b>	<b>16,32 Aa</b>	4,15 Bb	2,02 Bc	6,30 Ba	1,63 Bb	1,30 Ab	22,62 Ba	5,78 Bb	3,32 Bc
<b>CV (%)</b>	8,02			11,40			7,36		

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna e letras iguais minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

Analisando os dados de fitomassa total fresca e seca, não foi possível verificar diferença significativa entre os tratamentos com e sem inoculação bacteriana, na ausência e presença (1,0 e 2,25 %) de NaCl, exceto para as plântulas inoculadas com a bactéria UAGF16, que apresentaram redução de 23,80% nos resultados de fitomassa total seca, sob a presença de 1,0% de NaCl. A aplicação de estresse salino sob cada tratamento, diminuiu em 35,45% (1,0 % de NaCl) e 41,46% (2,25 % de NaCl) a fitomassa total fresca das plântulas. Entretanto sob a análise de fitomassa total seca não foi verificada influência do estresse salino (Tabela 5).

Esses resultados diferem dos encontrados por Gopalakrishnan et al. (2012) que ao caracterizar e avaliar o potencial de isolados bacterianos em plantas de arroz, submetidas a estresse salino, verificaram que quatro dos sete isolados foram capazes de aumentar significativamente o número de perfilhos, caule, folhas e rendimento de grão, além de incrementar a massa seca total e o comprimento de raízes de todas as plantas inoculadas sob essas condições adversas. Tiwari et al. (2011) também alcançaram resultados promissores em relação as análises de fitomassa. Ao inocular bactérias pertencentes a diferentes gêneros bacterianos em sementes de trigo, obtiveram maiores

resultados de comprimento de raiz, parte aérea e fitomassa em plantas inoculadas com as bactérias.

**Tabela 5.** Fitomassa total fresca e seca de plântulas de milho (*Zea mays*, var. São José) após a inoculação bacteriana sob a ausência (0%) e presença (1,0 e 2,25 %) de NaCl.

Tratamento	Fitomassa Total (g) *					
	Fresca			Seca		
	NaCl			NaCl		
	0%	1,0%	2,25 %	0%	1,0%	2,25 %
<b>Controle</b>	1,05 Aa	0,75 Ab	0,59 Ac	0,30 Aa	<b>0,30 Aa</b>	0,33 Aa
<b>UAGC 130</b>	1,11 Aa	0,69 Ab	0,64 Ab	0,29 Aa	<b>0,31 Aa</b>	0,32 Aa
<b>UAGC 348</b>	1,07 Aa	0,71 Ab	0,60 Ac	0,28 Aa	<b>0,32 Aa</b>	0,31 Aa
<b>UAGF 53</b>	1,05 Aa	0,64 Ab	0,66 Ab	0,30 Aa	<b>0,33 Aa</b>	0,35 Aa
<b>UAGF 16</b>	1,05 Aa	0,65 Ab	0,63 Ab	0,28 Ab	0,24 Bb	0,34 Aa
<b>CV (%)</b>	6,37			8,23		

\*Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma coluna e letras iguais minúsculas na mesma linha, não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.



#### 4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que:

- 1- A inoculação bacteriana promoveu aumento no IVG na presença de NaCl.
- 2- Todas as plântulas provenientes dos tratamentos com inoculação bacteriana apresentaram maior emissão de radícula (100%), na presença de 2,25% de NaCl.
- 3- As linhagens bacterianas UAGC130 (*Burkholderia cepacia*) e UAGC348 (*Burkholderia graminis*) nas análises de comprimento de radícula, parte aérea e total, se mostraram capazes de atenuar os efeitos do estresse salino sob as plântulas de milho. Sendo que, a linhagem UAGC130 (*Burkholderia cepacia*), por ser patógeno humano, não se recomenda a inoculação desta bactéria, em condições de ambiente protegido e de campo.
- 4- As bactérias UAGF53 e UAGF16 não foram capazes de amenizar os efeitos do excesso de NaCl, sob as características de PC, comprimento de radícula e total.
- 5- A inoculação bacteriana não foi capaz de promover incremento de fitomassa total fresca e seca em plântulas de milho, sob a ausência e/ou presença de NaCl.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOUMEN, H.; FILALI-MALTOUF, A.; NEYRA, M.; BELABED, A.; IDRISSEI, M.M. Effect of high salts concentration on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 889-898, 1999.

ALAMRI, S. A.; MOSTAFA, Y. S. Effect of nitrogen supply and Azospirillum brasilense Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation. **Saudi Journal of Biological sciences**, v.16, p. 101-107, 2009.

ANDRÉO-SOUZA, Y.; PEREIRA, A. L.; SILVA, F. F. S.; RIEBEIRO-REIS, R. C.; EVANGELISTA, M. R. V.; CASTRO, R. D.; DANTAS, B. F. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-manso. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 2, p.83-92, 2010.

COELHO, D. S.; SIMÕES, W. L.; MENDES, A. M. S.; DANTAS, B. F.; RODRIGUES, J. A. S.; SOUZA, M. A. Germinação e crescimento inicial de variedades de sorgo forrageiro submetidas ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.1, p.25-30, 2014.

EGAMBERDIEVA, D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. **Acta Physiol Plant**, v. 31, p. 861–864, 2009.

GAMALERO, E.; D'AMELIO, R.; MUSSO, C.; CANTAMESSA, S.; PIVATO, B.; D'AGOSTINO, G.; DUAN, J.; BOSCO, D.; MARZACHI, C. BERTA, G. Effects of *Pseudomonas putida* S1Pf1Rif against chrysanthemum yellows phytoplasma infection. **Phytopathology**, v. 8, p. 805-813, 2010

GOPALAKRISHNAN, S.; UPADHYAYA, H. D.; VADLAMUDI, S.; HUMAYUN, P.; VIDYA, M. S.; ALEKHYA, G.; SINGH, A.; VIJAYABHARATHI, R.; BHIMINENI, R. K.; SEEMA, M.; RATHORE, A.; RUPELA, O. Plant growth-promoting traits of

biocontrol potential bacteria isolated from rice rhizosphere. **Springer Plus**, v. 1, n. 71, p. 2-7, 2012.

JHA, B.; GONTIA, I.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant Soil**, v. 356, p. 265-277, 2012.

JHA, Y.; SUBRAMANIAN, R. B.; PATEL, S. Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoportectant against saline stress. *Acta Physiol Plant*, v. 33, p. 797-802, 2011.

LEITE, M. C. B. S.; FARIAS, A. R. B.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; FREIRE, M. B. G. S. Isolation, bioprospecting and diversity of salt-tolerant bacteria associated with sugarcane in soils of Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, (Suplemento), p. S73–S79, 2014.

LIMA, D. R. M. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. Dissertação (Mestrado). 110 p. 2012. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAPA – Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para Análise de sementes (RAS)**. Brasília, 399p. 2009.

MERCADO-BLANCO, J.; PRIETO, P. Bacterial endophytes and root hairs. **Plant Soil**, v. 361, p. 301-306, 2012.

NABTI, E.; SAHNOUNE, M.; GHOUL, M.; FISCHER, D.; HOFMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Restoration of growth of durum wheat (*Triticum durum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 6-22, 2010.

NIA, S.H.; ZAREA, M.J.; REJALI, F.; VARMA, A. Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.11, p. 113–121, 2012.

NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.

OLIVEIRA, G. P. **Maturação e qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** 99 p. 2012. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

PEREIRA, A.P.A.; BARROS, M.C.S.; OLIVEIRA, J.R.S.; RAMOS, A.P.S.; FREIRE, M.B.G.S.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético de *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 112-121, 2012.

QIN, S.; ZHANG, Y. J.; YUAB, B.; XU, P. Y.; XING, K.; WANG, J.; JIANG, J. H. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. **Plant Soil**, v. 354, p. 753-766, 2014.

SANTOS, I.B.; LIMA, D.R.M.; BARBOSA, J.G.; OLIVEIRA, J.T.C.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-

açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 142-149, 2012.

SHAHBAZ, M., ASHRAF, M. Improving salinity tolerance in cereals. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, p. 237–249, 2013.

SHILEV, S.; SANCHO, E. D.; BENLLOCH-GONZÁLEZ, M. Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. **Journal on Environmental Management**, v. 95 Supplement, p. 37-41, 2012.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi Journal of Biological sciences**, v. xx, p. xxx – xxx, 2014.

SHUKLA, P. S.; AGARWAL, P. K.; JHA, B. Improved Salinity Tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the Interaction of Halotolerant Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, p. 195–206, 2012.

SILVA, F. G. **Bactérias halotolerantes associadas a plantas de *Atriplex mummularia* L. e sua inoculação em mudas.** 90p. 2014. Dissertação (Mestrado). Pós Graduação em Produção Agrícola - Universidade Federal de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns.

TIWARI, S.; SINGH, P.; TIWARI, R.; MEENA K. K.; YANDIGERI, M.; SINGH, D. P.; ARORA, D. K. Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, p. 907-916, 2011.

UYANÖZ, R.; KARACA, U. Effects of different salt concentrations and *Rhizobium* inoculation (native and *Rhizobium tropici* CIAT899) on growth of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 387-391, 2011.