



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUIS GABRIEL CUEVA YESQUÉN

COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA CULTIVÁVEL DE *Passiflora incarnata* E SEU POTENCIAL NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

**CUTURABLE ENDOPHYTIC BACTERIAL COMMUNITY FROM *Passiflora incarnata*
AND THEIR POTENTIAL FOR PLANT GROWTH PROMOTING**

CAMPINAS

2018

Mestrado

LUIS GABRIEL CUEVA YESQUÉN

COMUNIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA CULTIVÁVEL DE *Passiflora incarnata* E SEU POTENCIAL NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

CUTURABLE ENDOPHYTIC BACTERIAL COMMUNITY FROM *Passiflora incarnata* AND THEIR POTENTIAL FOR PLANT GROWTH PROMOTING

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the State University of Campinas as part of the requisites required to obtain a Master degree in Genetics and Molecular Biology in the area of Genetics of Microorganisms.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
DISERTACAO DEFENDIDA PELO ALUNO LUIS
GABRIEL CUEVA YESQUÉN E ORIENTADO PELA
PROFA. DRA. FABIANA FANTINATTI-GARBOGGINI

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C894c Cueva Yesquén, Luis Gabriel, 1992-
Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Passiflora incarnata* e seu potencial na promoção de crescimento vegetal / Luis Gabriel Cueva Yesquén. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Fabiana Fantinatti Garboggini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Crescimento (Plantas). 2. *Passiflora incarnata*. 3. Endófitos. I. Fantinatti-Garboggini, Fabiana, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Culturable endophytic bacterial community from *Passiflora incarnata* and their potential for plant growth promoting

Palavras-chave em inglês:

Growth (Plants)

Passiflora incarnata

Endophytes

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabiana Fantinatti Garboggini [Orientador]

Valéria Maia Merzel

João Lucio de Azevedo

Data de defesa: 13-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 13 de julho do 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr.(a). FABIANA FANTINATTI GARBOGGINI

Dr.(a). VALERIA MAIA MERZEL

Dr.(a). JOÃO LUCIO DE AZEVEDO

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATORIA

A minha família inteira, porque tudo o que eu sou é produto de seu constante e incansável apoio. Especialmente a minha mãe porque sempre me deu o necessário e a meu irmão porque me ensinou que é possível fazer as coisas certas.

AGRADECIMENTOS

Expresso meus mais sinceros agradecimentos à Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini, por me ter dado a oportunidade e confiança de começar a vida acadêmica sob sua orientação.

À Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA/UNICAMP), às professoras Dra. Valéria Maia e Dra. Derlene Attili de Angilis quem concederam-me sua constante ajuda para o desenvolvimento do trabalho, aos técnicos Viviane Piccin dos Santos pela guia e paciência sempre oferecida durante o trabalho de bancada, Tulio Capelini, Ayumi Otzuka, Milena Binatti e Gilberto pelo oportuno e incondicional apoio.

À Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (CPQBA/UNICAMP), especialmente a MSc. Adriana da Silva Santos pela ajuda constante durante os ensaios quantitativos do presente estudo.

À banca de qualificação pelos conselhos e ajustes no projeto: professores Dra. Valéria Maia Merzel, Dra. Simone Possedente de Lira e Dr. José Marcos Salvador

A meus amigos da Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA/UNICAMP), à Marcela que foi o maior suporte acadêmico e pessoal que tive durante todo o mestrado, a Victor quem aportou substancialmente à qualidade científica deste estudo, à Melissa, Nataly, Paula, Thuanne, Kelly, Tiago Paladino, Tiago Rodrigues e Geomarcia que me permitiram passar momentos inesquecíveis, tanto em atividades acadêmicas como sociais.

À Alexandra quem foi sempre uma verdadeira companheira que me proporcionou as condições mais favoráveis para minha estância no Brasil.

Aos muitos colegas e amigos adquiridos durante o mestrado no Brasil, especialmente a Tiago quem foi um amigo incondicional e me deu sua mão sempre que precisei.

À PRONABEC pelo apoio financeiro.

À coordenação do Programa de Genética e Biologia Molecular a aos professores pela contribuição em minha formação.

RESUMO

Os endófitos bacterianos são micro-organismos que residem nos tecidos internos das plantas sem causar nenhum sintoma aparente de doença. Nesta interação planta-micróbio, a planta oferece um nicho complexo para a vida endofítica e as bactérias endofíticas desempenham diversas funções benéficas para o hospedeiro, como a aquisição de nutrientes essenciais, modulação de fito-hormônios e síntese de compostos que protegem a planta de estresses bióticos e abióticos. Estas características estão estreitamente relacionadas à Promoção de Crescimento Vegetal (PCV). Assim, a planta pode mostrar predisposição para ser colonizada por este grupo de endófitos benéficos de acordo com suas necessidades fisiológicas, o que depende principalmente da fase de desenvolvimento do hospedeiro. Este estudo teve como objetivo determinar a composição da comunidade bacteriana endofítica cultivável na fase vegetativa de *P. incarnata* e avaliar seu potencial para promover o crescimento vegetal. Os 58 isolados recuperados foram proporcionados pela Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP). A identificação dos isolados foi baseada na análise filogenética das sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S. Se avaliou o potencial de todos os isolados para a promoção do crescimento vegetal mediante uma abordagem fenotípica e genotípica. Com respeito a abordagem fenotípica, os isolados foram testados para a atividade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de ácido indol acético e produção de sideróforos. No caso da abordagem genotípica, se buscou a presença de genes relacionados à PCV (*nifH*, *ipdC*, *asb*, *AcPho*). A comunidade recuperada estava principalmente dominada por isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* (71%), seguido por *Pseudomonas* (9%) e *Pantoea* (7%). O filotipo com maior número de representantes foi *Bacillus aryabhatai* (10 isolados), seguido por *Bacillus megaterium* (9 isolados) e *Bacillus tequilensis* (6 isolados). Nos testes fenotípicos o 93% dos isolados mostraram atividade para ao menos uma característica de PCV, 47% mostraram resultados positivos para três características PCV e 10 isolados mostraram ser positivos para as quatro características PCV avaliadas. Na abordagem genotípica, 31% dos isolados mostraram a presença de ao menos um dos genes relacionados à PCV. Em determinados casos a abordagem genotípica complementou os resultados dos testes fenotípicos e em outros permitiu identificar atividade de PCV que a abordagem fenotípica não conseguiu. Os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus* estão fortemente relacionados com as características da PCV. Estes resultados sugerem que a predominância de componentes com potencial de PCV dentro da comunidade bacteriana associada a *P. incarnata* pode estar relacionada a necessidades fisiológicas específicas da fase vegetativa do hospedeiro.

Palavras chaves: Promoção de crescimento vegetal, *Passiflora incarnata*, endófitos

ABSTRACT

Bacterial endophytes are microorganisms that reside in the internal tissues of plants without causing any apparent symptoms of disease. In this plant-microbe interaction, plants provide a complex niche for endophytic life and the endophytic bacteria play several beneficial roles for the host such as the acquisition of essential nutrients, modulation of phytohormones and synthesis of compounds that protect the plant from biotic and abiotic stresses. These features are closely related with the Plant Growth Promoting (PGP). Thus, the plant may be predisposed to be colonized by this group of beneficial endophytes according to their physiological needs, which depends mainly on the host development stage. This study aimed to determine the composition of the endophytic bacterial community in the vegetative phase of *P. incarnata* and to evaluate its potential to promote plant growth. The 58 isolates that make up this community were provided by the Division of Microbial Resources of Research Center for Chemical, Biological and Agricultural (CPQBA-UNICAMP). The identification of isolates was based on the phylogenetic analysis of the partial sequences of the 16S rRNA gene. The potential of the whole community for the promotion of plant growth was evaluated through a phenotypic and genotypic approach. Regarding the phenotypic approach, the isolates were tested for nitrogen fixation, phosphate solubilization, indol acetic acid production and siderophores production. In the case of the genotypic approach, we searched for the presence of genes related to plant growth promotion (*nifH*, *ipdC*, *asb*, *AcPho*). The community was mainly dominated by isolates belonging to the genus *Bacillus* (71%), followed by *Pseudomonas* (9%) and *Pantoea* (7%). The phylotype with the highest number of representatives was *Bacillus aryabhatai* (10 isolates), followed by *Bacillus megaterium* (9 isolates) and *Bacillus tequilensis* (6 isolates). In the phenotypic tests, 93% of the community showed activity for at least one PCV characteristic, 47% showed positive results for three PCP traits and 10 isolates showed to be positive the four PCP traits evaluated. In the genotypic approach, 31% of the community showed the presence of at least one of the genes related to PCP. In some cases, the genotypic approach complemented the results of the phenotypic tests and in others it allowed to identify the PCV activity that the phenotypic approach did not achieve. The genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Paenibacillus* are strongly related to PCP features. These results suggest that the predominance of components with high potential PCP within the bacterial community associated with *P. incarnata* may be associated with specific physiological needs from vegetative stage of host.

Keywords: Plant growth promoting, *Passiflora incarnata*, endophytes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação do ensaio de fixação de nitrogênio em meio semi-sólido NFb. Reação positiva indicando o potencial de fixação de nitrogênio (A e B) evidenciado pela formação de biofilme embaixo da superfície do meio. Reação negativa (C) com ausência da formação de biofilme..... 38
- Figura 2.** Representação do ensaio colorimétrico de produção de AIA. Coloração rosa no meio indica a reação positiva (A e B) e a coloração do meio indica a reação negativa (C)..... 39
- Figura 3.** Curva padrão para determinação da concentração de AIA no teste colorimétrico..... 39
- Figura 4.** Representação do ensaio de produção de sideróforos em meio Ágar azul-CAS. Reação positiva (A e B) para produção de sideróforos evidenciada pela coloração laranja ao redor da linhagem e a reação negativa (C) pela permanência da cor azul do meio de cultura..... 41
- Figura 5.** Representação gráfica da estratégia *nested* PCR para amplificação do gene *nifH*. As posições foram inferidas da linhagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5 (NC_011365.1) 42
- Figura 6.** Frequência de bactérias Gram + e Gram – na comunidade bacteriana endofítica isolada de *Passiflora incarnata*..... 45
- Figura 7.** Frequência das bactérias endofíticas isoladas de folhas de *P. incarnata* em nível de filo, ordem, família e gênero. A classificação taxonômica foi baseada na similaridade das sequências do gene RNA ribossomal 16S do servidor *Identify*..... 47
- Figura 8a.** Árvore filogenética Neighbour-Joining baseada nas sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S dos isolados que compõem a comunidade bacteriana endofítica de *P. incarnata*. Valores de *bootstraps* são indicados como porcentagens derivadas de 1000 replicações. Valores inferiores a 65 não foram mostrados. O clado Firmicutes é exibido em detalhes e outros foram reduzidos..... 49
- Figura 8b.** Árvore filogenética Neighbour-Joining baseada nas sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S dos isolados que compõem a comunidade bacteriana endofítica de *P. incarnata*. Valores de *bootstraps* são indicados como porcentagens derivadas de 1000

replicações. Valores inferiores a 65 não foram mostrados. O clado para Firmicutes foi reduzido para exibir os filos Actinobacteria e Proteobacteria em detalhe.....	50
Figura 9. Árvore filogenética Neighbohr-Joining baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA de bactérias endofíticas EP178 e EP223 isoladas de folhas de <i>P. incarnata</i> em sua fase vegetativa. A análise foi baseada em 1405 posições. Valores de <i>bootstraps</i> são indicados como porcentagens derivadas de 1000 replicações. A linhagem <i>Azorhizophilus paspali</i> NBRC 102228 foi utilizada como grupo externo.....	51
Figura 10. Análise de rarefação das sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S em diferentes níveis de similaridade 99%, 97% e 95%.....	53
Figura 11. Biofilme bacteriano em meio semissólido NFb indicando a profundidade, e mm, do crescimento bacteriano. (A) Isolado EP182, (B) isolado EP229.....	54
Figura 12. Distribuição dos gêneros e espécies bacterianos endofíticos com potencial de fixação de nitrogênio indicado pelo ensaio em meio semissólido livre de nitrogênio NFb.....	55
Figura 13. Distribuição de gêneros bacterianos endofíticos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico indicado pelo ensaio em meio sólido NBRIP.....	56
Figura 14. Classificação dos gêneros bacterianos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico de acordo com Silva Filho e Vidor (2000)	57
Figura 15. Distribuição de gêneros bacterianos endofíticos com capacidade para produzir ácido indol acético ou similares (AIA).....	58
Figura 16. Produção média de AIA obtida por representantes dos gêneros endofíticos.....	59
Figura 17. Distribuição dos gêneros bacterianos com capacidade para produzir sideróforos.....	60
Figura 18. Médias dos valores de IPS dos gêneros endofíticos com capacidade para produzir sideróforos.....	61
Figura 19. Amplificação <i>nested</i> do gene <i>nifH</i> no isolado EP220. Tamanho esperado do produto final (2 ^o Rx): 374 pb. C+: Controle positivo.....	62
Figura 20. Amplificação do gene <i>AcPho</i> em alguns isolados. C-: controle negativo.....	63

Figura 21. Distribuição de filotipos bacterianos que carregam o gene <i>AcPho</i>	64
Figura 22. Amplificação do gene <i>ipdC</i> em alguns isolados. C-: controle negativo.....	65
Figura 23. Distribuição de filotipos bacterianos onde foram amplificados o gene <i>ipdC</i>	65
Figura 24. Amplificação do gene <i>asb</i> nos isolados EP185, EP202, EP214 e EP218. Amplificação inespecífica nos isolados EP190 e EP193. C-: controle negativo.....	67
Figura 25. Diagrama de Venn da ocorrência de isolados com potencial fenotípico e genotípico para solubilizar fosfatos (A), sintetizar AIA (B), produzir sideróforos (C) e as três atividades juntas (D).....	69
Figura 26. Esquema de intersecção da ocorrência de isolados com potencial fenotípico para promover o crescimento vegetal.....	70
Figura 27. Esquema de intersecção da ocorrência de isolados com potencial genotípico para promover o crescimento vegetal.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados na amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.....	36
Tabela 2. <i>Primers</i> para amplificar genes relacionados à promoção do crescimento em plantas.....	43
Tabela 3. Características fenotípicas representativos da comunidade endofítica de <i>P. incarnata</i>	44
Tabela 4. Valores de semelhança das sequências 16S rDNA dos isolados de <i>P. incarnata</i>	46
Tabela 5. Índices de diversidade e riqueza obtidos a partir das sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPCP - Bactérias Promotoras do Crescimento de plantas;

PCV – Promoção de Crescimento Vegetal

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias;

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas;

EDPCs - Enzimas que degradam a parede celular;

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool;

UFC – Unidades Formadoras de colônias

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ICPN - Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos, siglas em inglês;

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

RDP – *Ribosomal Database Project*;

ATP – Trifosfato de adenosina, siglas em inglês;

pb – pares de bases

NBRIP – *National Botanical Research Institute's phosphate growth medium*

AIA - ácido indol acético;

IAM – via indol acetamida;

IPA - indol-3-piruvato;

IAOx/IAN - indol-3-acetonitrila/indol-3-acetaldoxime

Fe₂O₃ – Óxido de Ferro (III);

Fe₃O₄ - Peróxido de Ferro (II);

M – Moles;

CAS - azurol-sulfonato de cromo;

TWYE – *Tap Water Yeast Extract medium*;

HV - *humic acid–vitamin médium*;

SDS – Dodecilsulfato de sódio;

°C – grau Celsius;

μL – microlitros;

mm – milímetros;

NaCl – Cloreto de sódio;

min – minutos;

rpm – revoluções por minuto;

% - por cento;

v/p – volumen por peso;

V – Volteios;

PCR – Reação em cadeia da polimerase, siglas em inglês;

RNA – Ácido ribonucleico;

MgCl₂ – Cloreto de magnésio;

OTUs – Unidades taxonômicas operacionais, siglas em inglês;

OD – Densidade ótica;

K₂HPO₄ – Fosfato de potássio;

MgSO₄ – Sulfato e magnésio;

CaCl₂ – Cloreto de cálcio;

KOH – Hidróxido de potássio;

HCl – Cloreto de hidrogênio;

pH – potencial hidrogeniônico;

g/L – gramas por litro;

Ca₃(PO₄)₂ – Fosfato de cálcio;

PBS – tampão fosfato salino, siglas em inglês;

MgSO₄ – Sulfato de magnésio;

KCl – Cloreto de potássio;

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de amônio;

ISF – Índice de Solubilização de fosfatos;

TSB – Caldo soja tripticaseína, siglas em inglês;

FeCl₃ – Cloreto férrico;

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico;

UV-Vis – Luz visível e ultravioleta;

µg/mL – micrograma por mililitro;

nm – nanômetros;

HDTMA – hexadeciltrimetilamônio;

NHCl₄ – Cloreto de amônio;

Pipes – 1,4-ácido Piperazinediethanesulfônico;

MnSO₄ – Sulfato de magnésio;

H₃BO₃ – Ácido bórico;

CuSO₄ – Sulfato de cobre;

ZnSO₄ – Sulfato de zinco;

NaMoO₄ - Molibdato de sódio;

TSA – Ágar soja tripticaseína, siglas em inglês;

IPS – Índice de produção de sideróforos

dNTP – *Deoxynucleotide*

BLAST – *Basic local alignment sequence tool*

BLASTN – *Standard Nucleotide BLAST*

BLASTX – *Translated BLAST*

UTR – *untranslated region*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 <i>Passiflora incarnata</i>	20
2.2 Micro-organismos endofíticos.....	21
2.3 Diversidade bacteriana endofítica associada as plantas.....	23
2.4 Taxonomia de bactérias.....	24
2.4.1 Análise do gene 16S rRNA em estudos de diversidade.....	25
2.5 Potencia biotecnológico das bactérias endofíticas na agricultura.....	26
2.6 Mecanismos de promoção do crescimento vegetal.....	27
2.6.1 Fixação biológica do nitrogênio atmosférico.....	28
2.6.2 Solubilização de fosfatos.....	29
2.6.3 Produção de fitormônios.....	31
2.6.4 Produção de sideróforos.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
4. MATERIAL E METODOS.....	34
4.1 Material biológico.....	34
4.2 Caracterização da comunidade bacteriana endofítica.....	34
4.2.1 Caracterização fenotípica.....	34
4.2.2 Caracterização genética.....	34
4.2.2.1 Extração de DNA genômico das bactérias endofíticas.....	34
4.2.2.2 Amplificação e purificação do gene 16S rRNA.....	35
4.2.2.3 Sequenciamento parcial do gene 16S RNA ribossomal.....	36
4.2.2.4 Montagem e análise filogenética das sequencias 16S RNA ribossomal.....	36
4.3 Análises de diversidade e rarefação.....	37
4.4 Potencial Fenotípico de promoção de crescimento vegetal.....	37
4.4.1 Fixação biológica do nitrogênio	37
4.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico.....	38

4.4.3 Detecção e quantificação de ácido indol acético (AIA) e derivados.....	38
4.4.4 Produção de sideróforos.....	40
4.5 Potencial Genotípico de promoção do crescimento em plantas.....	41
4.5.1 Amplificação do gene <i>nifH</i>	41
4.5.2 Amplificação de genes relacionados à promoção de crescimento vegetal.....	42
4.6 Análises estatísticas.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Caracterização fenotípica.....	44
5.2 Estrutura e composição de comunidade bacteriana cultivável.....	45
5.3 Análise filogenética.....	47
5.4 Diversidade e rarefação.....	51
5.5 Potencial fenotípico de promoção de crescimento vegetal.....	53
5.5.1 Fixação de nitrogênio.....	53
5.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico.....	55
5.5.3 Produção de ácido indol acético.....	57
5.5.4 Produção de sideróforos.....	59
5.6 Potencial genotípico de promoção do crescimento vegetal.....	61
5.6.1 Detecção do gene <i>nifH</i>	61
5.6.2 Amplificação do gene codificante da fosfatase ácida.....	62
5.6.3 Amplificação do gene <i>ipdC</i>	64
5.6.4 Amplificação do gene <i>asb</i>	66
5.7 Potencial fenotípico e genotípico de promoção de crescimento vegetal.....	67
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERENCIAS.....	73
APENDICES.....	86
ANEXOS.....	90

1. INTRODUÇÃO

O estudo das comunidades microbianas associadas a hospedeiros, nas últimas décadas, vem produzindo conhecimento relevante para entender o fenótipo do hospedeiro como resposta a variações bióticas e abióticas durante seu ciclo de vida. Além disso, permitiram revelar uma fonte interessante de moléculas bioativas, que em muitos casos eram atribuídas exclusivamente aos hospedeiros.

A comunidade endofítica mantém uma relação íntima como seu hospedeiro vegetal, de tal forma que o sucesso evolutivamente sustentável desta relação é devido à intervenção positiva dos endófitos nos processos de desenvolvimento da planta e nas respostas frente a estresses bióticos e abióticos. O hospedeiro oferece um ambiente (endosfera) menos exposto a mudanças ambientais (rizosfera ou filosfera) e especificamente nutritivo em cada tecido vegetal. Os microambientes que se formam nos distintos compartimentos da planta oferecem uma ampla variedade de condições para a colonização das populações endofíticas. Os fatores que vão determinar a estrutura e composição da comunidade endofítica estão relacionados com a condições ambientais que a planta suporta durante seu ciclo de vida e ao genótipo característico das espécies vegetais. No entanto, estes dois determinantes atuam simultaneamente e, portanto, devem ser estudados e analisados em conjunto. Uma característica das plantas que pode envolver os dois fatores são as diferentes fases de desenvolvimento da planta, desde que é afetada temporalmente pelas variações ambientais e apresenta um *status* fisiológico específico dependente do material genético que cada espécie carrega. Em cada fase de desenvolvimento se expressam necessidades fisiológicas que definem o fenótipo da planta. Especificamente na fase vegetativa da maioria das plantas, os requerimentos por macronutrientes, como o nitrogênio e fósforo, e micronutrientes, como o ferro, aumentam. Estes nutrientes essenciais geralmente não estão em sua forma assimilável para as plantas ou estão em quantidades no solo menores que as necessárias para uma produção agrícola ótima. Assim, as populações endofíticas emergem como sistemas biológicos que podem suprir estas necessidades fisiológicas, porque, além de disponibilizar nutrientes, possuem a capacidade de sintetizar e regular níveis de fito-hormônios que são determinantes do crescimento vegetativo. As bactérias com as propriedades antes mencionadas são conhecidas como Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP).

Assim, as plantas na fase vegetativa poderiam mostrar preferencialmente uma disposição a serem colonizadas por uma comunidade endofítica predominantemente representada por BPCP, que tenham um papel crítico para atender as necessidades fisiológicas nesta fase de

desenvolvimento. Neste contexto, o trabalho foi direcionado para a avaliação da estrutura e composição da comunidade bacteriana endofítica recuperada por técnicas microbiológicas de cultivo a partir de folhas de *Passiflora incarnata* em fase vegetativa. Os isolados que compõem esta comunidade foram fornecidos pela Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA-UNICAMP. Além disso, o potencial das distintas populações bacterianas para promover o crescimento vegetal foi avaliado do ponto de vista fenotípico e genotípico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Passiflora incarnata*

A *Passiflora incarnata* é classificada taxonomicamente como pertencendo ao filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Violales, e família Passifloraceae de acordo com a base de dados de espécimenes ARCTOS (<https://arctosdb.org/>). *P. incarnata* é uma planta perene de rápido crescimento com troncos de escalada ou de arrasto. Esta espécie é originária da América do Sul e sua cultura ocorre principalmente no Brasil e em algumas outras regiões tropicais da América, Ásia e Austrália (KIM M et al, 2017). A planta exibe folhas trilobuladas e pecioladas que alcançam até 15 cm de comprimento por 13 cm de largura. O crescimento exuberante da folhagem (fase vegetativa) é durante os meses de dezembro e janeiro (MIRODDI et al 2013). Na fase reprodutiva, as flores surgem isoladas das axilas e as partes florais são azul-arroxeadas. Esta planta possui flores hermafroditas, as quais são polinizadas por insetos, em sua maioria abelhas. As espécies de abelhas que polinizam as flores de *Passiflora* no Brasil são *Centris sp.* (75,69%), *Trigona spinipes* (20,14%) e *Apis mellifera* (4,17%) (MALERBO-SOUZA et al 2010). O fruto é carnoso, de forma ovoide a globosa, inicialmente verde e vermelho-amarelado na maturidade. A planta entra na fase reprodutiva a partir de abril até novembro (FUENTES et al, 2000). A flor da paixão como também é conhecida ocorre em solos arenosos e bem drenados, em áreas de mata úmida e abertas (MIRODDI et al 2013). Com respeito a sua cultura é considerada uma planta “heavy feeder”, de modo que geralmente precisa de um fertilizante balanceado com proporções semelhantes principalmente de nitrogênio, fósforo e potássio para o crescimento vegetativo (FUENTES et al, 2000).

P. incarnata foi descoberta pelo espanhol Monardes em 1569 durante uma expedição ao Perú, que retornou à Europa levando um exemplar para o Papa, quem relacionou a beleza da flor com a paixão do Cristo. No século 18 foi introduzida à medicina como terapêutico para ansiedade, insônia e epilepsia. Atualmente está incluída como fonte de fitoterápicos, em Farmacopeias Nacionais na França, Alemanha e Suíça, e na Farmacopeia Homeopática dos Estados Unidos (DHAWAN et al, 2004). Na medicina tradicional herbácea, *P. incarnata* tem sido prescrita para várias indicações, como ansiedade, nervosismo, constipação, dispepsia, infecções leves e insônia. No Brasil é utilizado como analgésico, antiespasmódico, antiasmático e sedativo (TAYLOR, 1996).

O abrangente potencial terapêutico de *P. incarnata* pode ser atribuído aos diversos fitoconstituintes bioativos sintetizados pela planta. As partes aéreas de *P. incarnata* são caracterizadas fito-quimicamente pela presença de um padrão de vários componentes primários

que consistem em flavonóides, maltol, glicosídeos cianogênicos e alcalóides de indol (SPENCER e SEIGLER, 1985; QUIMIN *et al.*, 1991; KRENN, 2001; MARCHART *et al.*, 2003). Os flavonóides são o maior fito-constituente de *P. incarnata*, representando 2,5 % dos componentes desta planta e a maior concentração foi encontrada nas folhas. Os flavonóides detectados em *P. incarnata* incluem a apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, 6- β -D-allopyranosyl-8- β -xilopiranosil-apigenina, C-glicosil flavonóides, vitexina, isovitexina, orientina, isorientina, schaftosideo, isoschaftosideo, isovitexina-2''-O-glucopiranosídeo, isorientina-2''-O-gluco-piranosídeo, 2-glucosylapigenina, isoscoparina-2''-O-glucósideo, 2''-O-glucosil-6-C-glucosil apigenina, 6- β -D-glucopiranosil-8- β -D-ribopiranosil apigenina e swertisina (GAVASHELI, 1974; GEIGER e MARKHAM, 1986; LI *et al.*, 1991; RAHMAN *et al.*, 1997; CHIMICHI *et al.*, 1998).

2.2 Micro-organismos endófitos

Os endófitos são definidos como todos os micro-organismos que vivem nos tecidos internos da planta sem causar nenhum dano nem sintoma aparente de doença (WILSON, 1995). O termo foi introduzido em 1886 por DE BARY para os micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) que colonizam tecidos internos da planta (DE BARY, 1884). Segundo Strobel e Days, todas as plantas são capazes de acolher um ou mais tipos de endófitos (STROBEL e DAYS, 2003). Os micro-organismos endófitos se distribuem através da endosfera vegetal e podem se estabelecer dentro das células vegetais ou em fluidos intercelulares (ROSENBLUETH e MARTINEZ-MORENO, 2006) e já foram recuperados de todos os compartimentos, como raízes, talos, folhas, frutos, sementes, e inclusive de inflorescências de ervas daninhas (BULGARI *et al.*, 2012; BHORE *et al.*, 2015).

A comunidade de micro-organismos endófitos pode representar um subgrupo dos micróbios que habitam o solo (ZARRAONAINDIA *et al.*, 2015) ou a atmosfera que rodeia as zonas superiores da planta (MAIGNIEN *et al.*, 2014). Portanto, são capazes de transitar de um estado de vida livre a um estilo de vida endófito (FARRAR *et al.*, 2014). A transmissão dos micro-organismos endófitos ocorre de maneira horizontal, vertical, ou através dos dois mecanismos em conjunto (BRIGHT e BULGHERESI, 2010). A maioria dos endófitos são provavelmente transmitidos de maneira horizontal. A partir de ambientes como a rizosfera ou filosfera, os endófitos conseguem atravessar as barreiras mais exteriores da planta, ultrapassando as eventuais respostas imunológicas do hospedeiro, para finalmente alcançar a endosfera. As portas de ingresso são as aberturas formadas durante o alongamento da raiz, os

estômatos, as feridas ou os hidatódios (KANDEL et al. 2017, FRANK et al 2017). Especificamente na transmissão horizontal de endófitos benéficos, a planta pode desempenhar um papel ecológico de ‘recrutador’ de micro-organismos benéficos como resposta as mudanças que ocorrem no ambiente da planta (CARROLL, 1988) o que inclui suas necessidades fisiológicas. No caso da transmissão vertical, o endófito se comporta como um hospede obrigatório e passa todo o seu ciclo de vida dentro do hospedeiro, sendo incapaz de sobreviver no ambiente. A teoria prediz que a transmissão vertical evolui como forma de assegurar a transmissão permanente entre gerações do hospedeiro de um endófito que cumpre uma função indispensável para a planta (HERRE et al, 1999). Porém as relações obrigatórias planta-endófito são raras, o que levaria a pensar que é provável que o micro-organismo ingresse primeiro de maneira horizontal, e uma vez dentro da planta sua relevância no desenvolvimento do hospedeiro acabe promovendo a transmissão vertical para as seguintes gerações. Este último fenômeno se refere à transmissão em conjunto (FRANK et al 2017).

Para que os endófitos adentrem aos tecidos vegetais é necessário que estes micro-organismos apresentem determinadas características que lhes confirmem a competência endofítica. Os lipopolissacarídeos, fatores Nod, flagelos, pili, motilidade de contração ou secreção de enzimas que degradam a parede celular (EDPCs) estão envolvidos na penetração ativa do hospedeiro vegetal (COMPANT et al, 2009). Porém, o processo de penetração não envolve necessariamente mecanismos ativos e, portanto, pode-se esperar que os micro-organismo que se encontram em ambientes próximos à planta passem ao estado endofítico em algum momento de seu ciclo de vida (HARDOIM et al., 2008).

Uma vez que o endófito atravessou as barreiras vegetais, este pode se estabelecer em qualquer compartimento da planta independente do ponto de entrada. Os micro-organismos endófitos podem colonizar o ambiente que oferece as melhores condições para seu estabelecimento. Endófitos provenientes da rizosfera ou rizoplano podem colonizar a raiz e alcançar densidades de 10^5 a 10^7 UFC/g de peso fresco (HALLMANN, 2001). Além de atingir a zona cortical da raiz, alguns endófitos que secretam EDPCs podem atravessar a endoderme e colonizar regiões mais internas da raiz (JAMES et al., 2002). A colonização dos vasos xilêmicos da raiz foi demonstrada no arroz e na videira por *Herbaspirillum seropedicae* (JAMES et al., 2002) e *Burkholderia phytofirmans* (COMPANT et al., 2005), respectivamente. Embora menos frequente, algumas populações endofíticas, depois de alcançar o lúmen do xilema, se distribuem sistematicamente até colonizar talos e folhas podendo atingir densidades entre 10^3 - 10^4 UFC/g de peso fresco (HALLMANN, 2001). O lúmen do xilema, portanto, representa para os micro-organismos endofíticos a principal via de distribuição em direção aos órgãos vegetativos e

reprodutivos da planta. A colonização endofítica dos órgãos reprodutivos tais como flores, frutos e sementes só atinge densidades entre 10^2 - 10^3 UFC/ g de peso fresco (HALLMANN, 2001), devido a tendência destes órgãos serem livres de micróbios.

Nesta forte interação ecológica, os endófitos podem ocorrer como micro-organismos comensais, benéficos ou potencialmente patogênicos. Embora destes três estados, a planta hospedeira protege o endófito e oferece um nicho que proporciona os nutrientes necessários para a colonização microbiana. Porém, não está totalmente esclarecido se residir na endosfera representa uma vantagem para os endófitos em relação aos micro-organismos que residem na rizosfera ou filosfera. Por outro lado, os endófitos podem cumprir um papel fundamental no desenvolvimento da planta; de maneira direta, proporcionando nutrientes indisponíveis e ao mesmo tempo essenciais para o crescimento da planta, ou de maneira indireta, protegendo a planta frente a estresses abióticos como a seca, luz e metais tóxicos, ou estresses bióticos como herbívoros, insetos e micro-organismos patogênicos (SANTOYO et al, 2015).

A abrangente diversidade de populações endofíticas associadas a uma planta representa uma fonte inestimável de micro-organismos com potencial para o melhoramento sustentável de culturas de importância agro-econômica. Por outro lado, estes micro-organismos endofíticos representam uma alternativa como sistemas de obtenção e produção de compostos bioativos que inicialmente eram característicos de seu hospedeiro vegetal. A aquisição destas funções biológicas por parte dos endófitos se deve à co-evolução com os hospedeiros vegetais (TAN e ZOU, 2001).

2.3 Diversidade microbiana endofítica associada às plantas

Uma ampla diversidade de bactérias tem sido descrita como endófitos e a maioria delas pertencem ao filo Proteobacteria, seguido por Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). O domínio Arquea não parece associar-se fortemente com as plantas. Porém, alguns estudos ecológicos que usaram técnicas independentes de cultura descrevem a ocorrência de grupos de Arqueas em superfícies de raízes antigas (GROKOPF et al., 1998), mas ainda não foram recuperadas de tecidos internos da planta.

Os fatores que podem determinar a estrutura e composição da comunidade endofítica estão relacionados com o hospedeiro ou o ambiente do hospedeiro. Especificamente, as características que regulam o microbioma da planta, incluem o genótipo e o tipo de tecido

da planta, no caso dos fatores bióticos; e as condições ambientais da localização e o tempo de amostragem, no caso dos fatores abióticos (AGLER et al, 2016). Embora os fatores abióticos e bióticos do hospedeiro possam regular a eficiência da colonização microbiana, eles não podem ser estudados isoladamente, uma vez que o hospedeiro como um holobionte é simultaneamente colonizado por uma abrangente diversidade de micro-organismos (LEBEIS, 2015). Um dos determinantes que podem cobrir os dois aspectos, bióticos e abióticos, é a fase de desenvolvimento que o hospedeiro se encontra, pois depende da carga genética da espécie vegetal e da fenologia do ciclo de vida. Um fator inerente da colonização endofítica é a construção de um novo nicho como consequência das mudanças provocadas por micro-organismos já estabelecidos. Determinadas populações endofíticas podem apresentar vantagem sob novas condições do nicho e continuar regulando a estrutura da comunidade endofítica. As mudanças causadas pela colonização microbiana incluem alterações no sistema de defesa (PIETERSE et al, 2014) e no metabolismo da planta (CHOU et al, 2000). Por tanto, as interações micróbio-micróbio dentro do hospedeiro são um fator dinâmico-temporal; desde que colonizadores primários podem afetar a penetração e o estabelecimento de colonizadores secundários.

Embora estudos de ecologia de comunidades endofíticas descritos nos últimos anos forneçam uma contribuição amplamente diferenciada proveniente de metadados, a comunidade científica ainda mantém um interesse importante pelos estudos dependentes de cultivo. A combinação de ambos métodos é altamente recomendada desde que os resultados refletem a estrutura e composição da comunidade microbiana mais precisamente do que quando se aplica um ou outro, independentemente (AL-AWADHI et al, 2013). Para recuperar a comunidade endofítica cultivável, geralmente as superfícies da planta são desinfestadas com hipoclorito de sódio ou soluções similares que cumpram a mesma função de excluir os micro-organismos contaminantes ou colonizadores passageiros da superfície da planta (MICHE e BALLANDREAU, 2001). O isolamento depende exclusivamente do meio de cultura, o qual deve conter os nutrientes necessários para a crescimento microbiano equitativo, e as condições de incubação mais próximas ao nicho ecológico da bactéria.

2.4 Taxonomia de bactérias

Os métodos microbiológicos tradicionais de classificação bacteriana eram baseados na caracterização profunda de seus atributos fenotípicos (morfologia, fisiologia e bioquímica) e no sistema de agrupamento intuitivo, criando uma imagem pouca resolutiva para determinar

o *status* taxonômico. A taxonomia bacteriana sofreu uma modernização devido ao desenvolvimento da taxonomia numérica computacional e os subsequentes métodos baseados em biologia molecular. Estes métodos incluem o sequenciamento completo do gene RNA ribossomal 16S e sua análise comparativa representadas árvores filogenéticas, estudos de hibridização DNA-DNA com organismos filogeneticamente próximos, análises de marcadores moleculares e padrões de assinatura (PRAKASH et al, 2007). Mais recentemente, com introdução de sequenciadores de alto desempenho, o sequenciamento de genomas completos foi introduzido à taxonomia como ferramenta importante para caracterização de novas espécies (Bennett et al, 2012). Assim, a taxonomia atual apresenta uma abordagem polifásica incluindo métodos genotípicos, quimio-taxonômicos e fenotípicos para determinar a posição taxonômica dos micro-organismos. Porém, a aplicação desta abordagem é possível para micro-organismo recém isolados ou já classificados e que podem ser potencialmente reclassificados, o que implica que estejam disponíveis técnicas para seu cultivo *in vitro*.

Considerando que alguns grupos bacterianos têm capacidades fisiológicas especializadas ou exigentes, impossibilitando sua manipulação *in vitro*, métodos independentes de cultivo vêm sendo amplamente utilizados para identificar a composição de comunidades microbianas (QIN *et al.*, 2012; ROMERO *et al.*, 2014). Estudos ecológicos com esta abordagem molecular demonstraram que um número elevado de grupos taxonômicos, ainda não haviam sido descritos (BRESSAN et al., 2009; IKEDA et al., 2010). O sequenciamento de alto desempenho na ecologia molecular proporcionou inclusive mais descrições taxonômicas para os micro-organismos ainda não cultivados, comparado com a qualidade de informação genética que se tem de alguns organismos cultiváveis. Produto da necessidade de atribuir uma nomenclatura aos organismos, ainda não cultivados em condições de laboratório, foi o criado o status taxonômico *Candidatus* (MURRAY e SCHLEIFER, 1994); mas, esta categoria provisional não é aceita pelo Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos (ICPN, siglas em inglês) (PARKER et al., 2015). Portanto, Konstantinidis et al (2017) propôs um plano de etapas para uma nova taxonomia baseada no genoma recuperado, visando incluir a grande maioria das espécies microbianas ainda não cultivadas.

2.4.1 Análise do gene RNA ribossomal 16S em estudos de diversidade

Os genes ribossomais são considerados o melhor alvo para estudar as relações filogenéticas que existem entre as bactérias, motivo pelo qual estão presentes em todos estes organismos, são funcionalmente constantes e alternam domínios altamente conservados e

regiões variáveis (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994). O gene RNA ribossomal 5S rRNA foi a primeira molécula a ser sequenciada para numerosas bactérias por causa de suas estruturas primárias e secundárias menos complexas (WOLTERS e ERDMANN, 1988). Porém, o sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S tem sido considerado mais adequado não apenas para identificar, mas também para esclarecer as relações filogenéticas dos micro-organismos procariontes (DAS et al, 2014). Uma das principais vantagens no uso deste marcador filogenético é a leitura de uma sequência nucleotídica (aproximadamente 1500 pb), relativamente fácil de sequenciar, e que pode conter as informações suficientes para identificação e análise de filogenia (CLARRIDGE, 2004). O uso do gene RNA ribossomal 16S possibilitou um incremento crítico da informação acerca da diversidade dentro do domínio Bacteria, aumentando de 12 a 92 o número de filos bacterianos listados na base de dados do NCBI. Atualmente existem vários projetos que recebem, avaliam e fornecem uma base de dados de sequências do gene RNA ribossomal 16S (RDP, EzBioCloud) que além de serem usadas em análises de identificação, classificação ou posicionamento taxonômico de bactérias cultiváveis também são determinantes críticos nas análises de diversidade de metadados.

2.5 Potencial biotecnológico das bactérias endofíticas na agricultura

A agricultura intensificou-se amplamente no século XX devido aos benefícios econômicos trazidos pela aplicação inconsciente de práticas que incluem o uso de equipamentos agrícolas, variedades de culturas de alto rendimento, manipulação intensiva de solos, irrigação, fertilizantes, pesticidas e outros insumos fabricados industrialmente (FOLEY et al, 2015). Porém, todas estas práticas produziram implicações negativas para a segurança alimentar humana, biodiversidade e funcionalidade do ecossistema agrícola. Como consequência, a busca por novas alternativas que não causem efeitos negativos para os sistemas agrícolas aumentou exponencialmente (BJORNBERG et al, 2015). O interesse está concentrado em alternativas que visem manter ou melhorar a produção agrícola e afrontar as condições desfavoráveis que incluem organismos patogênicos, pragas ou ambientes extremos.

Os micro-organismos intimamente relacionados com as plantas compõem uma comunidade que podem influenciar no desenvolvimento e na saúde do hospedeiro. São consideradas três as relações simbióticas que existem na interação planta-microrganismo; o parasitismo, que afeta negativamente a saúde da planta; o comensalismo, que não causa alterações no fenótipo do hospedeiro vegetal e o mutualismo que afeta positivamente o desenvolvimento de planta (LEBEIS, 2015). O mutualismo nas interações planta-

microrganismo pode ser obrigatório como trata-se das micorrizas (associação fungo-raiz) ou facultativo como é o caso dos endófitos benéficos. Os endófitos como organismos de vida livre podem alternar passagens de seu ciclo vida dentro ou fora de um hospedeiro vegetal (COMPANT et al, 2010). No entanto, as populações endofíticas que mantêm uma relação evolutivamente estável com o hospedeiro são as que geralmente trazem algum benefício à planta. Distintos grupos de bactérias endofíticas são capazes de exercer um benefício, através de mecanismo diretos ou indiretos, no desenvolvimento de seu hospedeiro (SANTOYO et al, 2015). Estas exercem benefício de forma direta quando as populações bacterianas possuem a capacidade de modular níveis de fitormônios ou facilitar a aquisição de nutrientes essenciais para a planta; e de forma indireta quando induzem proteção contra estresse do tipo biótico ou abiótico (SANTOYO et al, 2015). O grupo de bactérias que alteram positivamente o desenvolvimento e rendimento de culturas vegetais são amplamente conhecidas como Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas. O aproveitamento responsável dos efeitos benéficos das BPCP representa uma nova alternativa para a agricultura moderna e sustentável, a qual busca diminuir a dependência e o uso descontrolado de fertilizadores inorgânicos e pesticidas químicos.

A principal proposta para a aplicação biotecnológica das bactérias promotoras de crescimento em plantas é o desenvolvimento de bioinoculantes ou inoculantes microbianos. Estas formulações estão baseadas em um micro-organismo, um consórcio de micro-organismos, ou em produtos bioativos provenientes da fermentação do micro-organismo. A adição direta ou indireta destas formulações melhora a disponibilidade de nutrientes para o hospedeiro vegetal e promove seu crescimento (TALLAPRAGADA e SESHAGIRI, 2017). No entanto é preciso aprofundar o estudo dos mecanismos moleculares de promoção de crescimento vegetal para otimizar o desenvolvimento dos bioinoculantes.

Por outro lado, para a exploração e detecção de bactérias endofíticas com potencial de bioinoculante é necessário também conhecer do ponto de vista ecológico, quais são os fatores que regulam a ocorrência, colonização e estabelecimento das populações bacterianas endofíticas nativas.

2.6 Mecanismos de promoção do crescimento vegetal

Os mecanismos diretos pelas quais as BPCPs exercem um efeito positivamente quantitativo e/ou qualitativo no crescimento das plantas estão relacionadas com a disponibilização de nutrientes essenciais e escassos, e com a sínteses de compostos reguladores

do crescimento vegetal. Ademais, podem afetar indiretamente o desenvolvimento das plantas através da indução de resistência contra doenças causadas por fatores bióticos (pragas ou organismos patogênicos) ou contra condições abióticas (luz, seca, salinidade ou outros) (GLICK, 2012). O nitrogênio, fósforo e ferro são nutrientes que, geralmente, estão em um estado no qual a planta não pode capturá-los e utilizá-los para seu crescimento. Diversas BPCPs são capazes de suprir estas necessidades através da fixação biológica do nitrogênio, solubilização do fosforo precipitado no solo, ou pela captura do ferro insolúvel e, como consequência, disponibilizá-los à planta. Além de disponibilizar nutrientes indispensáveis para o crescimento vegetal, algumas BPCPs sintetizam fito-hormônios (auxinas, acetileno, citoquininas) que regulam o desenvolvimento do hospedeiro. Estes benefícios nem sempre são realizados ao aplicar as BPCPs como bioinoculantes em condições de campo (COMPANT et al, 2010). Ainda assim, as BPCPs isoladas de tecidos internos da planta possuem uma competência endofítica para chegar até a endosfera vegetal e exercer os benefícios esperados, o que lhe confere vantagens sobre as bactérias provenientes de outros nichos (HARDOIM et al., 2008).

2.6.1 Fixação biológica do nitrogênio

O nitrogênio é um dos três elementos químicos mais abundantes na natureza, depois do carbono e o hidrogênio (GREENWOOD e EARNSHAW, 1997). A relevância deste elemento químico nos organismos vivos é compreendida desde que está presente em componentes essenciais como, proteínas, ácidos nucleicos e, especificamente, na clorofila que permite a fotossíntese das plantas (LEGHARI et al, 2016). No entanto, as plantas só podem assimilar o nitrogênio ambiental na forma de amônio ou nitrato, e por tanto o nitrogênio atmosférico (a forma mais abundante no ambiente) deve ser reduzido para estar disponível a planta.

A fixação biológica do nitrogênio conduzida por organismos procarióticos conhecidos como diazotrofos, é o processo pelo qual o nitrogênio é reduzido e assimilável para as plantas. A reação consiste na quebra do triplo enlace no nitrogênio atmosférico ($N\equiv N$) com um gasto energético de 16 moles de ATP, e como produto principal, a liberação de amônio (NH_4^+). Um complexo enzimático chamado nitrogenase catalisa a reação de fixação de nitrogênio. A ocorrência deste complexo é limitada para determinadas Eubactérias e Arqueas (GALLOWAY et al 2008). No entanto, a diversidade de diazotrofos não se limita a suas relações filogenéticas (YOUNG, 1992), mas também a distribuição ecológica. Os diazotrofos

podem ocorrer em ambientes altamente flutuantes (solo ou água), ambientes intimamente relacionados às plantas (rizosfera ou filosfera) ou nos tecidos internos das mesmas. Aqueles diazotótrofos que não estão em uma associação simbiótica com a planta ou que eventualmente podem colonizar compartimento vegetais são conhecidos como diazotótrofos de vida livre. Inicialmente se acreditava que a capacidade dos diazotótrofos de vida livre para fixar o nitrogênio se exercia exclusivamente na rizosfera ou rizoplano, excluindo a endófitos desta propriedade. Entretanto, foi demonstrado que nos tecidos internos do talo e raiz da cana de açúcar residia uma bactéria endofítica identificado como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988), e da qual foi reportado um grande potencial para fixar o nitrogênio, inclusive, nas quantidades requeridas para a cultura da espécie vegetal (STEPHAN et al, 1991).

O complexo nitrogenase é codificado por um cluster de genes (*nif*) estruturais, reguladores e suplementares que podem completar de 20 a 24 Kb, os genes estão organizados em 7 *operons*, codificam 20 proteínas e podem ocorrer no genoma bacteriano ou plasmidial. A nitrogenase Fe codificada pelo gene *nifH* e a nitrogenase Mo-Fe codificada pelos genes *nifK* e *nifD* são reconhecidas como as proteínas chaves na catalise da redução do nitrogênio (RUBIO e LUDDEN, 2008; SEEFELDT et al, 2009). Devido à complexidade do sistema de fixação de nitrogênio nas bactérias tem sido complicado induzir mudanças genéticas que melhorem o rendimento de sistema (GLICK, 2012). Portanto, a manipulação do sistema fixador é relativamente depende do isolamento do organismo diazotrófico.

As bactérias fixadoras de nitrogênio têm sido isoladas em meios de cultura com diferentes formulações que tem em comum a ausência de componentes nitrogenados. Esta estratégia microbiológica combina o ambiente microaerofílico, necessário para ação estabilidade da enzima nitrogenase, e a ausência do nitrogênio como critério seletivo para o crescimento de diazotótrofos (BALDANI et al, 2014).

2.6.2 Solubilização de fosfatos

O fósforo é o nutriente mais importante para a nutrição e crescimento das plantas, depois do nitrogênio. Ele está presente na maioria dos processos metabólicos das plantas como, a fotossíntese, a transferência de energia, a tradução de sinais, a síntese de macromoléculas e a respiração (KHAN et al, 2010). Apesar de ser abundante no solo formando compostos orgânicos ou inorgânicos, só um 0,1% de sua totalidade está disponível para ser assimilado pelas plantas (ZHOU et al, 1992). O fósforo insolúvel ocorre em sua forma inorgânica, como a apatita, ou como formas orgânicas, incluindo fosfato de inositol (fitato do solo),

fosfomonômeros e fosfotriésteres (KHAN et al, 2007). Assim como para o nitrogênio, existem mecanismos pelo quais o fósforo é fixado. Este processo consiste na remoção de fósforo disponível a partir de uma solução sólida do solo (BARBER 1995). No entanto, o fósforo fixado não supre as quantidades requeridas para a produção agrícola e, portanto, é necessário a adição de fertilizantes químicos que impõem impactos ambientais adversos na saúde ambiental. Inclusive, grande parte fósforo assimilável dos fertilizantes rapidamente é imobilizado quando aplicado no solo (GLICK, 2012). Portanto, a pouca disponibilidade de fósforo assimilável é um fator limitante para o crescimento das plantas.

Os micro-organismos têm um papel crítico em todos os ciclos biogeoquímicos e no ciclo do fósforo não são a exceção. Eles podem solubilizar e mineralizar o fósforo proveniente de compostos orgânico e inorgânicos em uma forma disponível para absorção radicular (KHAN et al, 2009). São diversos os mecanismos pelos quais os micro-organismos podem solubilizar o fósforo, os que incluem: (1) a liberação de compostos que dissolvem minerais fosforados, (2) secreção de enzimas extracelulares e (3) liberação de fosforo assimilável durante a degradação de substratos (MCGILL e COLE, 1981). Adicionalmente, uma liberação importante de fosforo assimilável poder ter entre seus motivos a uma alta taxa de lises de células bacterianas (BUTTERLY et al. 2009). A solubilização de fósforo em sua forma inorgânica ocorre principalmente pela produção e liberação de compostos ácidos (MALIHA et al. 2004) que incluem em sua maioria ácido glucônico (BAR-YOSEF et al, 1999), ácido oxálico, ácido cítrico (KIM et al., 1997), ácido láctico, ácido tartárico, ácido aspártico. Estes compostos ácidos são produto do metabolismo microbiano que geralmente provem da respiração oxidativa ou fermentação de compostos orgânicos (TROLOVE et al. 2003). O principal mecanismo envolvido na solubilização de fosforo a partir de compostos orgânicos é a secreção de enzimas as que incluem, fosfatases ácidas não específicas (NANNIPIERI et al. 2011), fitases (RICHARDSON, 1994), fosfonatase e liases C-P (RODRIGUEZ et al 2006). Meios de cultura como o Pikosvkaya (PIKOVSKAYA, 1948) ou o NBRIP (NAUTIYAL, 1999) são amplamente utilizados para o isolamento de micro-organismos solubilizadores de fosfato. O princípio de estes meios de cultura está baseado na produção de ácidos orgânicos microbianos que se secretam e difundem no meio formando um halo transparente ao redor da colônia microbiana. As populações bacterianas que maiormente foram associadas com a capacidade de solubilização de fosfatos pertencem aos gêneros: *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Achromobacter* (RODRIGUEZ et al, 2007; PARK et al 2010).

2.6.3 Produção de fito-hormônios

Os fito-hormônios são moléculas reguladoras do crescimento e desenvolvimento da plantas e da resposta frente as distintas condições ambientais (DURBAK et al, 2012) A planta afronta durante todo seu ciclo de vida exposições a condições desfavoráveis, como consequência vias de sínteses de fito-hormônios se ativam como o objetivo de diminuir os efeitos negativos de tais condições (SALAMONE et al, 2005). Apesar de ser reconhecidas como moléculas de origem vegetal, existem diversas populações bacteriana com capacidade de sintetiza fito-hormônios que incluem ácido índole acético (auxina), giberelinas ou citoquininas (BOTTINI et al, 2004; TSAVKELOVA et al. 2006). Por tanto as bactérias podem intervir na produção e regulação de hormônios vegetais e ser determinantes do fenótipo da planta. Os fito-hormônios neste contexto podem assumir o papel de componentes chaves nas interações planta-micróbio.

O fito-hormônio auxina regula um amplo repertório de processos de desenvolvimento nas plantas e sua síntese não está limitada as plantas. Diversos estudos reportaram que bactérias patogênicas (JAMESON, 2000) como benéficas (PERSELLO-CARTIEAUX et al, 2003; SPAEPEN et al, 2007) possuem diversas vias metabólicas para sínteses da principal e mais frequente auxina, o ácido indol acético (AIA). O AIA atua principalmente em processos envolvidos no crescimento vegetativo; estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta o crescimento do xilema e da raiz; inicia formação radicular lateral e adventícia; intervêm na respostas frente á luz, gravidade e florescimento; afeta a fotossíntese, a formação de pigmentos, a biossíntese de vários metabólitos e a resistência a condições de estresse (TSAVKELOVA et al. 2006; SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011).

O principal precursor para síntese do AIA é o triptofano, a partir do qual se diferenciam em até cinco vias metabólicas diferentes. Estudos in vitro reportaram que algumas linhagens bacterianas podem produzir pequenas quantidades de IAA na ausência do precursor. No entanto, na presença de L-triptofano, as bactérias frequentemente liberam quantidades muito maiores de IAA (ALI et al. 2009). Em vários micro-organismos estudados, observa-se a redundância das vias sintéticas do AIA, o que significa que mais de uma via ocorre e pode estar ativa em um mesmo micro-organismo (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011). As principais vias de sínteses de AIA incluem: indol-3-acetamida (IAM), indol-3-piruvato (IPA), indol-3-acetonitrila/indol-3-acetaldoxime (IAOx/IAN) (DUCA et al, 2014). A via metabólica IAM ocorre em principalmente em bactérias fitopatogênicas e pode contribuir na virulência nessas linhagens desde que produz grandes quantidades de AIA (JAMESON, 2000). A principal via

de síntese de AIA nas plantas é a IPA, que curiosamente ocorre mais frequentemente em bactérias endofíticas benéficas como linhagens de *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Pantoea agglomerans* (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011). Embora que *P. agglomerans* é constantemente reconhecida como uma bactéria patogênica, existem linhagens associadas a plantas que se comportam como mutualistas (DUTKIEWICZ et al, 2016). O fato de que a via IPA seja tão comum em plantas como em bactérias endofíticas representam mais uma prova que as relações evolutivas na interação planta-endófito podem trazer como resultado transferências genéticas entres estes dois organismos. No caso da via metabólica IAOx/IAN, é tão comum em bactéria patogênicas como benéficas (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011).

2.6.4 Produção de sideróforos

O ferro é o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre. No solo pode estar formando minerais comuns como a hematita (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4), e limonite [$\text{FeO}(\text{OH})$]. No entanto em condições aeróbicas (oxidantes) e pH neutro, o Fe está presente principalmente em forma mineral Fe (III), o qual é essencialmente insolúvel e conseqüentemente limita sua disponibilidade a concentrações de 10^{-18} M (RYMOND E CARRANO, 1979). Os micro-organismos (10^{-9} a 10^{-4} M) e as plantas (10^{-7} a 10^{-5} M) precisam de concentrações acima da antes mencionada dentro das condições “normais” de crescimento (SCHWAB E LINDSAY, 1983; LANKFORD, 1973). Por tanto são necessários agentes com a capacidade de capturar ao ferro em suas formas insolúveis e disponibiliza-lo.

Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular (500-1500 Dalton) tipicamente produzidos por bactérias, fungos e plantas monocotiledôneas em resposta ao estresse do ferro (RATLEDGE e DOVER, 2000). O sideróforos quelam o íon férrico (Fe^{+3}) com alta especificidade e atuam como veículos de transporte para levar o ferro dentro das células (NEILANDS, 1981). A pesar que variam amplamente em estrutura foram classificados baseado na natureza química do sítio de união ao ferro. Os tipos de sideróforos incluem: catecolatos, hidroxamatos, α -carboxilatos, e em combinações destes (WINKELMANN, 2002).

Uma ampla variedade de microrganismos desde patógenos de humanos até micróbios ambientais como as BPCP são capazes de sintetizar sideróforos. Por tanto sua detecção e quantificação sempre foi de interesse para a comunidade científica. A capacidade de produção de Sideróforos por micro-organismos é comumente detectada pelo ensaio de azurol-sulfonato de cromo (CAS), desenvolvido por Schwyn e Neilands (1987).

3. OBJETIVOS

Avaliar a diversidade e o potencial de promoção de crescimento vegetal da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada a *Passiflora incarnata* em sua fase vegetativa.

3.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotípica- e genotipicamente as bactérias endofíticas recuperados de folhas de *Passiflora incarnata*;
- Determinar a estrutura e composição da comunidade bacteriana endofítica;
- Avaliar a capacidade das bactérias endofíticas de promover o crescimento vegetal por meio de uma abordagem fenotípica e genotípica;
- Selecionar bactérias endofíticas candidatas à formulação de bioinoculantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

As bactérias endofíticas utilizadas neste estudo fazem parte do acervo de pesquisa da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas. Estas bactérias foram isoladas pela doutoranda Marcela Cristina Goulart e representam a comunidade endofítica cultivável recuperada dos tecidos foliares no estágio vegetativo de *P. incarnata* coletadas em janeiro/2016 nos campos agrícolas do Grupo Centroflora localizados na cidade de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Para isolamento as folhas foram esterilizadas na superfície e moídas asépticamente em PBS (tampão salino de fosfato) e logo as suspensões foram inoculadas em sete meios de cultura, incluindo o meio mínimo M9, ágar sintético Gause, ágar TWYE, ágar HV, ágar glicerol-asparagina, meio de quitina (ZHAO et al., 2012) e meio 869 (EEVERS et al, 2015). Os isolados endofíticos foram selecionados com base nas morfologias das colônias, purificados e preservados a -80 °C (NAKAMURA, 1996)

4.2. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica

4.2.1 Caracterização fenotípica

Todos os cinquenta e oito isolados bacterianos foram reativados em seus meios de isolamento e incubados a 28 °C durante 24 a 48 h. As bactérias endofíticas foram caracterizadas fenotipicamente de acordo com a morfologia da célula e da colônia.

Da morfologia da colônia foram considerados: cor, tamanho (diâmetro), superfície (áspera, com ou sem brilho, lisa ou rugosa), textura (seca, úmida, viscosa, mucoide ou quebradiça), margem (regular ou irregular) e elevação. Para as características morfológicas das células foram observados tamanho e forma, e a reação frente a coloração de Gram.

4.2.2 Caracterização genética

4.2.2.1. Extração de DNA genômico das bactérias endofíticas

Os isolados bacterianos foram cultivados no mesmo meio de isolamento e condições de cultivo. A cultura bacteriana foi centrifugada e ao sedimento obtido foram adicionados 700 µL de tampão TE, 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida,

a suspensão foi agitada e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno e 500 µL de fenol foram adicionados, sendo então a suspensão homogeneizada por inversão e centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de polipropileno e adicionados 500 µL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de polipropileno com 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (5:4:1), homogeneizado, centrifugado e coletado. Em seguida, foi adicionado 0,1 volume de NaCl (5 M) e 0,6 volume de isopropanol. A mistura foi mantida por 10 min à temperatura de 6 °C e centrifugada por 15 min a 10.000 g. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 40 °C por 20 min e suspenso em 50 µL de água deionizada esterilizada.

A avaliação da pureza e quantificação do DNA das linhagens foram realizadas por meio da comparação do DNA do fago λ em diferentes concentrações em gel de agarose a 1% (v/p) corado com 2% de SYBR® Safe DNA gel (Invitrogen). O gel de agarose foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X por 30 min em condição de 5 V por centímetro. O DNA foi visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografado em sistema digital de fotodocumentação (Image Quant LAS 4000, GE).

4.2.2.2 Amplificação e purificação do gene RNAr 16S

O gene RNA ribossomal 16S foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando os *primers* 10F, 1401R e 1525R (Tabela 1) homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias conforme descrito por Lane, 1991 (LANE, 1991). A reação de PCR foi realizada em 25 µL de volume final, contendo 0,2 mM de cada dNTP, 1X de buffer (Tris 20 mM, pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 1 U de Taq polimerase e 10 ng de DNA genômico. O protocolo de ciclagem da PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 3 min, seguido por uma extensão final a 72 °C por 5 min em termociclador (MasterCycler Gradient 5331, Eppendorf). Os produtos de PCR foram separados por eletroforeses em gel de agarose a 1% (v/p) e o tamanho do fragmento estimado por comparação com um marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Gene Ruler 1Kb, Thermo Scientific). Os fragmentos parciais do gene RNA ribossomal 16S (aproximadamente 1500 bp) foram purificados utilizando o kit de purificação PCR GFX™ (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

4.2.2.3 Sequenciamento parcial do gene RNA ribossomal 16S

Os produtos purificados foram sequenciados pelo método de Sanger usando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Life Technologies) e os mesmos *primers* usados para a amplificação do gene RNA ribossomal 16S, incluindo o 1100r, 765R e 782R (Tabela 1). O protocolo de ciclagem da reação de sequenciamento consistiu em uma desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguido por 30 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min. Os *amplicons* foram submetidos a uma eletroforese capilar no sequenciador da série ABI3500XL (Applied Biosystems).

Tabela 1. *Primers* utilizados na amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.

<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	%GC
10F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG	52,63
765F	ATTAGATACCCTGGTAG	41,17
782R	ACCAGGGTATCTAATCCTGT	45,00
1100R	AGGGTTGCGCTGGTTG	62,5
1401R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGAAGG	66,66
1525R	AAGGAGGTGWTCCARCC	52,94

4.2.2.4 Montagem e análise filogenética das sequências do gene RNA ribossomal 16S

As sequências do gene RNA ribossomal 16S foram visualizadas, editadas e montadas em *contigs* (sequências consenso) no software BioEdit 7.2.6.1 (HALL, 1999). As sequências dos *primers* foram retiradas antes da montagem. As sequências consenso foram submetidas ao servidor *Identify* da plataforma EzBioCloud (YOON et al., 2017). O servidor proporcionou uma lista dos organismos mais próximos baseada em valores de similaridade da sequência do gene RNA ribossomal 16S. Ao menos as três sequências mais próximas ao isolado endófito foram recuperadas e utilizadas nas análises posteriores. As sequências de referência e as obtidas a partir dos isolados foram alinhadas no programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1997). O alinhamento múltiplo resultante foi utilizado nas análises filogenéticas conduzidas no programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o

modelo de *p-distance* (KIMURA, 1908) e a reconstrução da árvore filogenética foi baseada no método estatístico *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987), com valores de *bootstrap* (FALSENSTEIN, 1985) de 1.000 réplicas.

4.3 Análises de diversidade e rarefação

A partir das análises de filogenia foram identificados filotipos, que para fins desta análise foram considerados como Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). Os índices de diversidade (Shannon-Weaver) (HILL et al., 2003) e estimadores de riqueza (Chao1) (CHAO e LEE, 1992) dos OTUs foram calculados no programa Past3 (HAMMER et al, 2001) e utilizados para montar um gráfico de rarefação em diferentes níveis de similaridade 99, 97 e 95%. As estimativas de riqueza e curva de rarefação indicam o nível de amostragem necessária para obter uma cobertura satisfatória da comunidade estudada e o índice de Shannon-Weaver indica a uniformidade e a abundância de espécies que ocorrem em uma comunidade.

4.4 Avaliação do potencial de promoção de crescimento em plantas

Os cinquenta e oito isolados identificados foram analisados quanto ao potencial para fixar o nitrogênio atmosférico, produzir ácido indol acético, solubilizar fosfatos inorgânicos e secretar sideróforos.

4.4.1 Fixação biológica do nitrogênio

O potencial de fixação de nitrogênio dos isolados foi avaliado qualitativamente *in vitro*, em um meio livre de nitrogênio. Todos os isolados foram crescidos em meio TSA (*Trypticase Soy Agar*) a 28 °C por 24 h. A biomassa de cada cultura foi lavada duas vezes com água destilada esterilizada, visando excluir componentes do meio de cultura que pudessem conter nitrogênio. A biomassa foi suspensa em PBS para obter suspensões ajustadas com OD₆₀₀ 0,6-0,7. Uma alíquota (30 µL) de cada suspensão bacteriana foi inoculada dentro de tubos de vidro (20 X 100 mm) com tampa de rosca contendo 4 mL do meio semi-sólido NFb (5 g de ácido málico, 0,5 g de K₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g de NaCl, 0,02 g de CaCl₂.2H₂O, 2,0 mL de azul de bromotimol (5g L⁻¹ em 0,2 N KOH), solução de vitaminas (10 mg de biotina e 20 mg piridoxal-HCl em 100 mL de água destilada,), 4,5g de KOH, água destilada para um volume final de 1000 mL e ajustar o pH a 6,5 e agar 1,6 a 1,8 g/L) (BALDANI *et al.*, 1986) e incubados a 28°C por 96 – 120 h.

O crescimento bacteriano foi confirmado a partir de 72 h de incubação com a visualização da formação de um biofilme embaixo da superfície do meio de cultura conforme mostrado na Figura 1. Foram realizadas três repetições para cada isolado bacteriano, além de re-inoculações para confirmar a estabilidade do potencial fixador de nitrogênio.

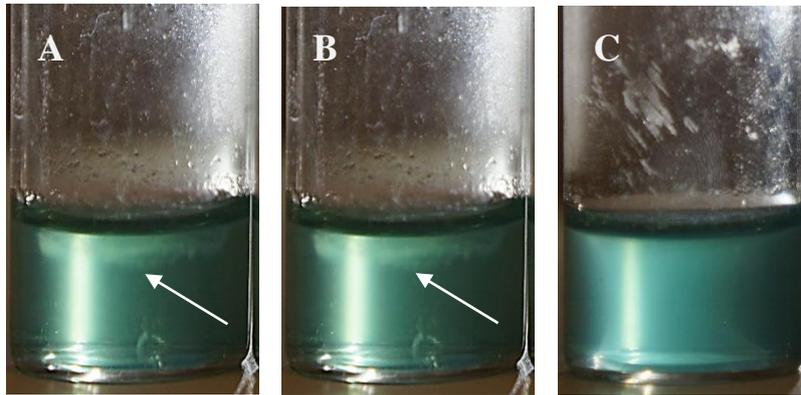


Figura 1. Representação do ensaio de fixação de nitrogênio em meio semi-sólido NFb. Reação positiva indicando o potencial de fixação de nitrogênio (A e B) evidenciado pela formação de biofilme embaixo da superfície do meio. Reação negativa (C) com ausência da formação de biofilme.

4.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico

A capacidade das bactérias para solubilizar fosfato foi avaliada do acordo com Nautiyal (1999) em meio contendo fosfato insolúvel $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Inicialmente, os isolados foram crescidos em meio TSA a 28 °C por 24 h. Cada cultura bacteriana foi lavada duas vezes com água destilada esterilizada e o *pellet* foi suspenso em PBS para uma OD_{600} 0.6-0.7. Triplicatas contendo 15 μl de cada suspensão foram inoculadas em placa de Petri contendo 25 mL de meio sólido NBRIP (10 g de glicose, 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KCl, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 15 g de ágar, pH 7) (NAUTIYAL, 1999). As placas foram incubadas por pelo menos 7 dias a 28 °C.

A solubilização do fosfato foi identificada pela presença de um halo translúcido ao redor da colônia. Para fins quantitativos, a capacidade das bactérias em solubilizar o fosfato insolúvel foi representada pelo índice de solubilização de fosfatos (ISF) conforme: relação do diâmetro total (colônia + halo) e o diâmetro das colônias (EDI-PREMONO *et al.*, 1996).

4.4.3 Detecção e quantificação de ácido indol acético (AIA) e derivados

A produção de ácido indol acético foi estimada no meio TSB (*Trypticase Soy Broth*) suplementado com 1 mg/mL de L-triptofano. Os isolados foram inoculados por triplicata em 20 mL do meio de cultura e incubados a 28 °C, sob agitação constante (150 rpm), durante 48 h no escuro. Após o tempo de incubação a cultura foi centrifugada a 8000 rpm a 4 °C por 15 min e 1 mL de sobrenadante foi misturado com 2 mL de reagente de Salkowski (1,5 mL de 0,5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mL de H_2SO_4 e 50 ml de H_2O) e incubado por 30 min a temperatura ambiente, no escuro. A coloração rosa na superfície do meio indica a produção de AIA e/ou derivados (Figura 2). A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro UV-Vis a 530 nm de comprimento de onda λ (TANG e BONNER, 1948). A concentração de AIA em cada amostra foi estimada usando uma curva padrão (Figura 3), obtida com diferentes concentrações (0,4; 1; 2, 4; 8; 16; 33; 42 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 3) de AIA comercial (Sigma-Aldrich).

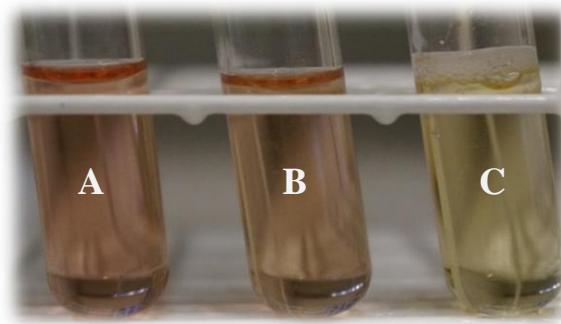


Figura 2. Representação do ensaio colorimétrico de produção de AIA. Coloração rosa no meio indica a reação positiva (A e B) e a coloração do meio indica a reação negativa (C).

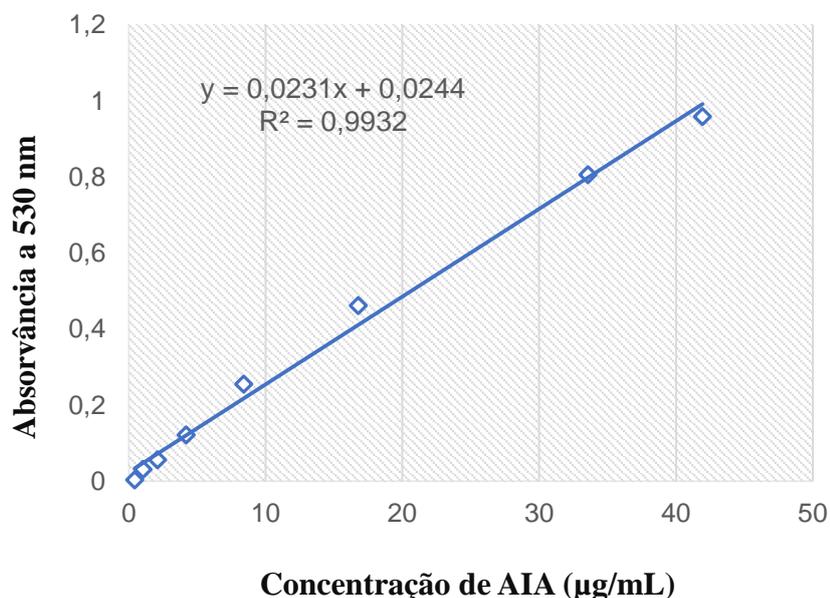


Figura 3. Curva padrão para determinação da concentração de AIA no teste colorimétrico.

4.4.4 Produção de sideróforos

A capacidade das bactérias endofíticas para produzir sideróforos foi avaliada pelo método azulol-sulfonato de cromo (CAS) (SCHYN e NEILANDS, 1987). Os isolados foram inoculados no meio sólido Agar Azul. Para preparar 1 litro de Agar color azul são necessários 4 tipos de soluções, conforme descrito abaixo (MILAGRES *et al.*, 1999; JI *et al.*, 2014).

Solução 1. 60,5 mg de CAS (Chrome azulol S) em 50 mL água foram misturados com 10 mL de solução de Ferro (1 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM de HCl). Sob agitação, foram adicionados nesta solução 72,9 mg de HDTMA dissolvido em 40 mL de água. O líquido azul escuro resultante foi esterilizado e mantido a 50 °C.

Solução 2. 30,24 g Pipes (ácido 1,4-Piperazinediethanesulfônico) foram adicionados em 750 mL de uma solução de sais contendo 0,3g KH_2PO_4 , 0,5g de NaCl, 1,0g NH_4Cl . Uma solução de NaOH 50% (p/p) foi adicionada para ajustar o pH da solução de Pipes até o valor de 6,8. Por último foram adicionados 15 g de água e o meio foi esterilizado e mantido a 50 °C.

Solução 3. 2,0 g de glicose, 2,0 g de manitol, 439,0 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,0 mg de CaCl_2 , 1,17 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg de $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,2 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 70 mL de água destilada. A solução foi esterilizada e mantida a 50 °C.

Solução 4. Consiste de uma solução ácida de 30 mL de casaminoácidos a 10% (p/v) que foi esterilizada por filtração.

Todas as soluções foram misturadas e 25 mL da mistura final foram vertidas em placas de Petri. As bactérias endofíticas foram crescidas em meio TSA a 28 °C por 24 h. Cada cultura bacteriana foi lavada duas vezes com água destilada esterilizada e o *pellet* foi suspenso em PBS para uma OD_{600} 0,6-0,7. Uma alíquota (15 μL) de cada suspensão foi inoculada em um disco de difusão esterilizado e colocado no centro da placa contendo o meio Ágar Azul-CAS (HUSSEIN e JOO, 2014). O método do disco de difusão foi utilizado para evitar o efeito tóxico do sulfonato de cromo-azulol em micro-organismos, principalmente para bactérias Gram-positivas. As placas foram incubadas a 30 °C e observadas diariamente quanto ao desenvolvimento de um halo amarelo-alaranjado ao redor da colônia (Figura 4). Os testes foram feitos em triplicata.

Para fins quantitativos, a capacidade das bactérias para produzir sideróforos foi representada pelo índice de produção de sideróforos (IPS): relação do diâmetro total (colônia + halo) e o diâmetro das colônias.

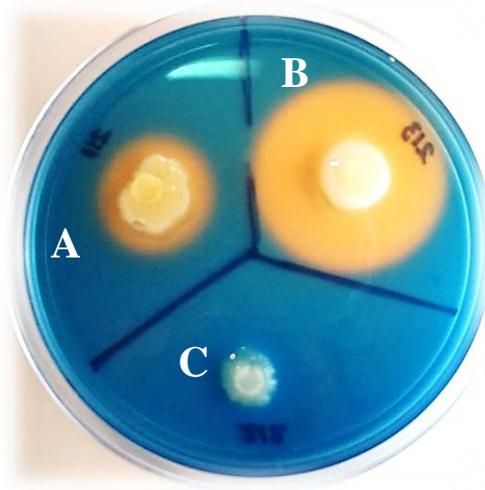


Figura 4. Representação do ensaio de produção de sideróforos em meio Ágar azul-CAS. Reação positiva (A e B) para produção de sideróforos evidenciada pela coloração laranja ao redor da linhagem e a reação negativa (C) pela permanência da cor azul do meio de cultura.

4.5 Potencial Genotípico de promoção do crescimento em plantas

Uma abordagem utilizando PCR foi aplicada para incrementar a cobertura de detecção do potencial de promoção de crescimento em plantas, baseado na amplificação de genes funcionais relacionados aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

4.5.1 Detecção do gene *nifH*

A detecção do gene *nifH* é uma evidência indireta do potencial de uma bactéria para fixar o nitrogênio. O gene foi amplificado com dois sets de *primers* usando a técnica *nested* PCR. Três *primers*, desenhados originalmente por Zehr e Reynolds (1989) foram utilizados na reação de amplificação (BURGMANN et al, 2004). O primeiro PCR foi realizado com o par *forward primer nifH* (forA) (5'-GCIWTITAYGGNAARGGNGG-3') e *reverse primer nifH* (rever) (5'-GCRTAIABNGCCATCATYTC-3'). O segundo PCR (*nested*) foi realizado como o *forward primer nifH* (forB) (5'-GGITGTGAYCCNAAVGCNGA-3') e o mesmo *reverse* da primeira reação. O produto final amplificado foi de aproximadamente 371 bp.

A primeira amplificação foi realizada num volume final de 25 μ L, contendo 10 ng de DNA genômico, 2 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 1 U de Taq Polimerase Recombinant (Invitrogen), e 1X de tampão de PCR. A reação *nested* foi realizada num volume final de 25 μ L, 1 μ L do produto da primeira reação, 1 μ M de cada *primer*, 0,2 mM

de cada dNTP, 2 mM MgCl₂, 1 U de Taq Polimerase Recombinant (Invitrogen), e 1X de buffer de PCR. As condições de anelamento foram 30 s a 55°C e 30 s a 53°C para a primeira e segunda reação, respectivamente. Na primeira reação foram aplicados 30 ciclos e na segunda 35 ciclos (BURGMANN *et al.*, 2004) em termociclador (*MasterCycler Gradient 5331, Eppendorf*). Como controle positivo foi utilizado a linhagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5, conhecida pela sua atividade fixadora do nitrogênio. Os produtos de PCR foram separados por eletroforeses em gel de agarose a 1% (v/p) e o tamanho do fragmento estimado por comparação com um marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Gene Ruler 1Kb, Thermo Scientific).

Para confirmar que foi amplificada uma sequência parcial do gene *nifH*, foram purificados os produtos de PCR com o kit de purificação PCR GFX™ (*GE Healthcare Life Sciences*, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante e logo sequenciados no sequenciador da série ABI3500XL (*Applied Biosystems*), seguindo o mesmo protocolo de sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.

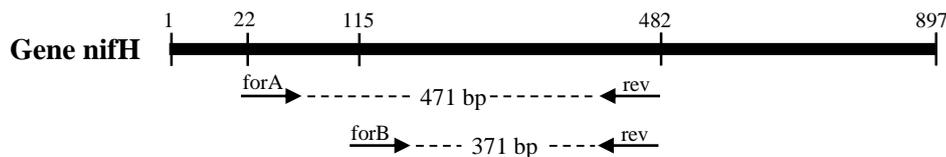


Figura 5. Representação gráfica da estratégia *nested* PCR para amplificação do gene *nifH*. As posições foram inferidas da linhagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5 (NC_011365.1).

4.5.2 Detecção de genes relacionados à promoção de crescimento em plantas

A produção de IAA foi avaliada por amplificação parcial do gene *ipdC* (indol piruvato descarboxilase), que codifica a enzima mais importante na via do ácido indol-3-pirúvico (IPyA). O IPyA é a via utilizada pela maior parte das bactérias benéficas (*Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*) (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011). A respeito da síntese de sideróforos foi parcialmente amplificado o gene *asb* que codifica a petrobactina, um sideróforo do tipo catecol comumente secretado por *Bacillus* spp. (KOPPISCH, 2008). No caso da solubilização de fosfatos, foi rastreado o gene que codifica a fosfatase ácida, enzima envolvida na mineralização da maioria dos compostos orgânicos de fósforo no solo (EL-SAWAH, 1993).

A reação foi conduzida de acordo com Raddadi et al. (2007). O volume final (25 µL) da reação continha 0,2 mM de cada dNTP, 1X tampão de PCR (Tris 20 mM, pH 8,4), 2,5 mM MgCl₂, 0,5-1,0 m µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 25 ng de DNA genômico. O protocolo de ciclagem de PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 45 s de anelamento à temperatura adequada (Tabela 2) e 72 °C por 2 min, seguido de uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforeses em gel de agarose a 1% (v/p) e o tamanho do fragmento estimado por comparação com um marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Gene Ruler 1Kb, Thermo Scientific). A confirmação da sequência parcial do gene alvo foi feita por sequenciamento conforme protocolo utilizado para o sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.

Tabela 2. *Primers* para amplificar genes relacionados à promoção do crescimento em plantas.

Gene alvo	Tamanho do gene	Sequência do primer (5'3')	T° anelamento	Amplicon (pb)
<i>ipdC</i>	1809 bp	CAYTTGAAAACKCAMTATACTG ^a	55°	1715
		AAGAATTTGYWKGCCGAATCT ^b		
<i>asb</i>	1685 bp	GAGAATGGATTACAGAGGAT ^a	50°	1685
		TTATGAACGAACAGCCACTT ^b		
Fosfatasa ácida	828 bp	AAGAGGGGCATTACCACTTTATTA ^a	55°	734
		CGCCTTCCCAATCRCCATACAT ^b		

^a Sequência forward

^b Sequência reverse

4.6 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização fenotípica

Os cinquenta e oito isolados bacterianos foram reativados utilizando os mesmos meios de isolamento. As características fenotípicas macro e microscópicas revelaram uma complexa diversidade de formas e texturas. A Tabela 3 apresenta as variantes morfológicas mais representativas encontradas dentre os isolados recuperados. A maioria dos isolados cresceram formando colônias medianas ou grandes entre as primeiras 24 a 48 h de incubação, exceto os isolados EP208 e EP225 cujo crescimento em meio sólido foi observado entre 72 a 96 horas. As colônias apresentaram coloração branca para amarela em diferentes tons. A observação das células após a coloração de Gram revelou que todos os isolados tinham forma bacilar e que a maior parte deles (75,8%) era Gram positiva (Figura 6). Estudos de diversidade endofítica em folhas de *Oryza sativa* (MANO et al., 2007), e raízes de *Citrus lemon* (GARDNER et al., 1982) e *Medicago sativa* (GAGNE et al., 1987) mostraram dominância de bactérias Gram negativas, mas é preciso ressaltar que o isolamento nesses estudos foi a partir de plantas em etapas avançadas de desenvolvimento. Em contrapartida, nosso estudo recuperou bactérias da fase vegetativa, apoiando a hipótese de que a etapa de desenvolvimento da planta pode determinar a composição das comunidades endofíticas bacterianas.

Tabela 3. Características fenotípicas representativas da comunidade endofítica de *P. incarnata*.

Isolado	Meio de cultivo	Forma e textura da colônia	Tamanho da colônia	Cor da colônia	Forma da célula	Reação ao Gram
EP176	Gaus's agar	Redondo, úmida	Mediano	Amarelo opaco	Bacilar	+
EP178	Gaus's agar	Redondo, úmida	Mediano	Amarelo	Bacilar	-
EP179	Gaus's agar	Ondulado, seca	Grande	Branco cremoso	Bacilar	+
EP185	869 agar	Ondulado, seca	Grande	Branca	Bacilar	+
EP187	Gly-asp agar	Redondo, mucoide	Grande	Branco cremoso	Bacilar	+
EP199	869 agar	Redondo, seca	Mediano	Branco opaco	Bacilar	+
EP200	M9M agar	Ondulado, úmida	Pequena	Amarelo	Bacilar	-
EP206	TWYE agar	Ondulado, úmida	Mediano	Branco-vermelhas	Bacilar	+
EP207	M9M agar	Redondo, úmida	Pequena	Amarelo	Bacilar	-
EP208	M9M agar	Redondo, úmida	Pequena	Branco	Bacilar	-
EP235	Gaus's agar	Redondo, seca	Pequena	Amarelas	Bacilar	+

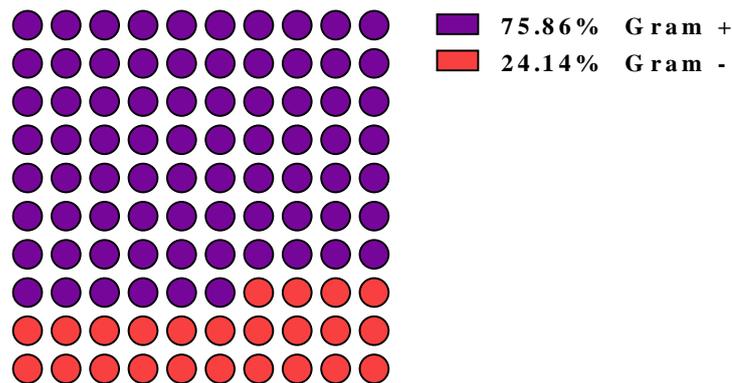


Figura 6. Frequência de bactérias Gram + e Gram – na comunidade bacteriana endofítica isolada de *Passiflora incarnata*.

5.2 Estrutura e composição de comunidade bacteriana endofítica cultivável

Sequências de aproximadamente 1300 nt foram obtidas do sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S. As sequências foram submetidas ao servidor *Identify* da plataforma EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>), procurando os parentes mais próximos. Todos os alinhamentos apresentaram valores de similaridade iguais ou maiores a 99% com as sequências de referência das linhagens tipo (Tabela 4), permitindo atribuir potencialmente uma identificação em nível de espécie. A análise agrupou os isolados em 3 filos: Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. O filo Firmicutes foi o mais abundante (41/58 isolados), representado unicamente pela ordem Bacillales (77,59%), seguido do filo Proteobacteria (15/58 isolados) dominado pelas ordens Pseudomonadales (8,62%), Enterobacterales (8,62%) e Xanthomonadales (1,72%). As bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria (2/58 isolados) foram unicamente relacionadas à ordem Corynebacterales (3,45%) (Figura 7).

A identificação de bactérias endofíticas em nível de família revelou que Bacillaceae (72,41%) foi o grupo mais abundante e, juntamente, com Enterobacteriaceae (10,34%) e Pseudomonadaceae (8,62%) representaram mais do 90% da comunidade bacteriana recuperada no isolamento. Por outro lado, em nível de gênero, membros do gênero *Bacillus* (70,69%) representaram a população bacteriana mais abundante, seguido por *Pseudomonas* (8,62%), *Pantoea* (6,9%), *Rhodococcus* e *Paenibacillus* (3,45%) (Figura 7). Resultados similares foram reportados no estudo conduzido por VENDAN et al. (2010), onde o gênero *Bacillus* representou 90% da diversidade endofítica associada a plantas jovens (de um ano) do Ginseng coreano. Os demais gêneros (*Lysinibacillus*, *Kosakonia*, *Xanthomonas* e *Leclercia*) corresponderam apenas o 1,72% da comunidade. Representantes destes gêneros já foram reportados como endófitos em estudos prévios (SHABANAMOL et al 2018; WALITANG et al 2017, SHAHZAD et al, 2017).

Adicionalmente, neste estudo *Bacillus* foi o gênero com maior diversidade de espécies potencialmente identificadas com base na similaridade de sequências comparadas ao banco de dados (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de semelhança das sequências 16S rDNA dos isolados de *P. incarnata*.

Isolados	Parente mais próximo ^a	No de Acesso ^b	Similaridade (%)
EP176	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	AJ716019	99,1
EP177,181,188,189,190, 192,221,228,229,231	<i>Bacillus aryabhatai</i>	EF114313	99,92
EP178,201,215,223	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	FMWB01000061	99,52
EP220	<i>Pseudomonas cichorii</i>	FNIK01000055	99,12
EP179,180,182,183,197, 203,233	<i>Bacillus tequilensis</i>	AYTO01000043	99,93
EP184,186,191,193,196, 210,211,213,224	<i>Bacillus megaterium</i>	JJMH01000057	100
EP218	<i>Bacillus cereus</i>	AE016877	100
EP202	<i>Bacillus wiedmannii</i>	LOBC01000053	100
EP185	<i>Bacillus anthracis</i>	AE016879	99,93
EP208, 225	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	BCRM01000055	100
EP187	<i>Bacillus velezensis</i>	AY603658	99,93
EP194,195,217	<i>Bacillus siamensis</i>	AJVF01000043	99,92
EP198	<i>Bacillus altitudinis</i>	ASJC01000029	100
EP199,209,227,230	<i>Bacillus safensis</i>	ASJD01000027	99,92
EP200	<i>Pantoea stewartii</i>	JPKO01000033	99,77
EP205,222	<i>Pantoea ananatis</i>	JMJJ01000010	99,92
EP204	<i>Pantoea vagans</i>	EF688012	99,78
EP206	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	AB271743	99,92
EP207	<i>Xanthomonas sacchari</i>	Y10766	99,58
EP212	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	CLG_48537	99,38
EP214	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ACNF01000156	99,93
EP216	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	BCNP01000062	99,6
EP226	<i>Kosakonia cowanii</i>	BBEU01000098	99,6
EP234	<i>Bacillus nealsonii</i>	EU656111	99,29
EP235	<i>Bacillus gibsonii</i>	X76446	99,84

^aEspécie do parente mais próximo na base de dados de sequências do gene RNA ribossomal 16S.

^bNúmero de acesso das sequências do gene RNA ribossomal 16S das espécies tipo obtidas do EzBioCloud.

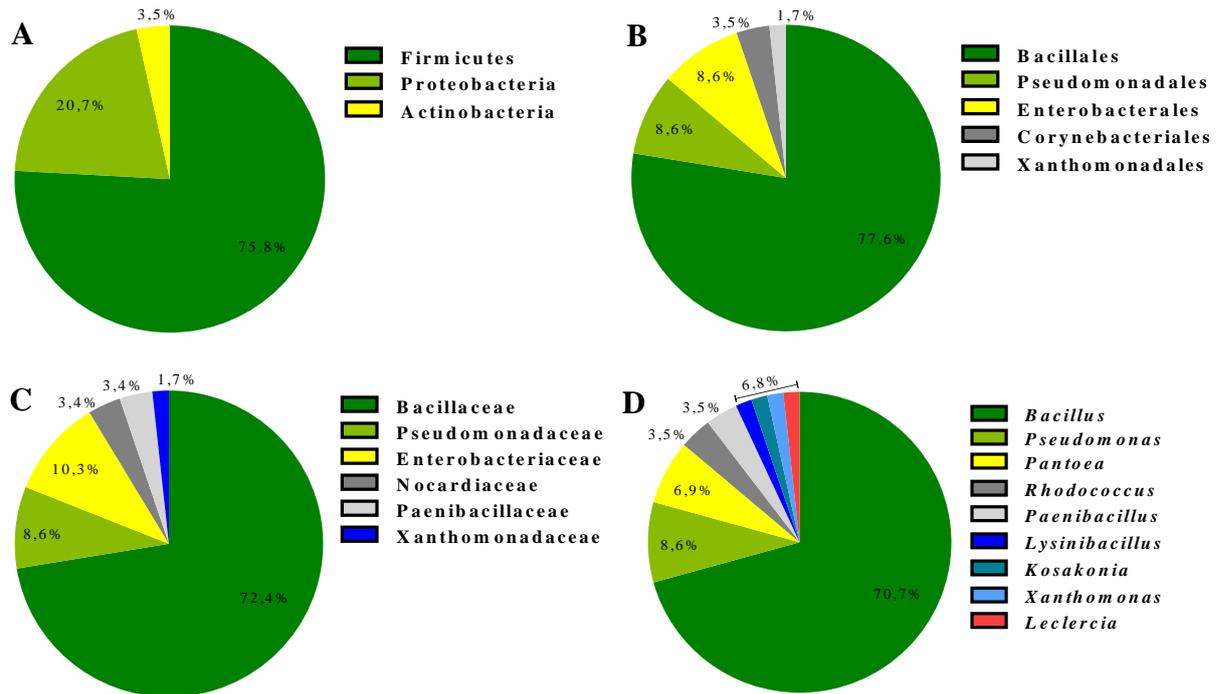


Figura 7. Frequência das bactérias endofíticas isoladas de folhas de *P. incarnata* em nível de filo (A), ordem (B), família (C) e gênero (D). A classificação taxonômica foi baseada na similaridade das sequências do gene RNA ribossomal 16S do servidor *Identify*.

Os gêneros bacterianos *Bacillus*, *Paenibacillus* (GARDENER, 2004; GOVINDASAMY et al, 2011) e *Pseudomonas* (MERCADO-BLANCO e BAKKER, 2007) são grupos taxonômicos aos quais mais frequentemente são atribuídas propriedades relacionadas com a promoção do crescimento de plantas, desde que foi amplamente reportada sua capacidade para disponibilizar nutrientes essenciais para o crescimento vegetativo ou produzir reguladores (ex. auxina, etileno) do desenvolvimento da planta. Em nosso estudo, os endofíticos que pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* representaram o 83% (48/58 isolados) da estrutura da comunidade cultivável recuperada, sugerindo que a comunidade esteja predominantemente representada por BPCP.

5.3 Análise filogenética

As sequências do gene RNA ribossomal 16S das linhagens tipo mais próximas aos isolados, foram recuperadas do servidor *Identify* da plataforma EzBioCloud. O alinhamento global das sequências dos parentes mais próximos e dos isolados foi conduzido no programa ClustalW, gerando 1206 posições para construção de árvore filogenética. A topologia da árvore filogenética mostrou o estabelecimento compatível de clados entre isolados e linhagens tipo com valores de *bootstrap* maiores que 60% (Figura 8). Portanto, a análise filogenética das

sequências do gene RNA ribossomal 16S permitiu a identificação dos isolados até nível de espécie. A análise filogenética das sequências do gene RNA ribossomal 16S é uma estratégia comumente usada para a identificação de micro-organismos (CLARRIDGE, 2004). No entanto, estudos têm reportado de 99 a 100% a similaridade entre as sequências do gene RNA ribossomal 16S nas espécies do grupo *Bacillus cereus* (ASH et al, 1991), sugerindo que as sequências do gene RNA ribossomal 16S podem não ser úteis para discriminação de membros de grupo filogeneticamente muito próximo. Nestes casos é recomendável abordar outros genes marcadores que permitam aumentar a resolução entre espécies.

A partir da análise filogenética foi possível inferir que a comunidade endofítica recuperada é composta por 24 filotipos. O filotipo predominante foi *Bacillus aryabhattai* (10 isolados), seguido por *Bacillus megaterium* (9 isolados), *Bacillus tequilensis* (6 isolados), *Bacillus safensis* (4 isolados) e *Bacillus velezensis* (4 isolados) (Figura 8a). Estas espécies juntas representam a metade da comunidade endofítica recuperada. Por outro lado, *Paenibacillus barcinonensis*, *Pseudomonas psychrotolerans*, *Kosakonia cowanii* e *Bacillus nealsonii* não foram anteriormente descritas como espécies endofíticas, e foram isoladas da planta *P. incarnata* (Figura 8a e 8b). Todos os demais filotipos já foram recuperados de folhas e outros compartimentos vegetais de diferentes plantas (BENHIZIA et al., 2004; TORRES et al., 2008; STUDHOLME et al., 2011; TOYOTA, 2015; SHARMA et al., 2015; CAI et al., 2016; SONG et al, 2017).

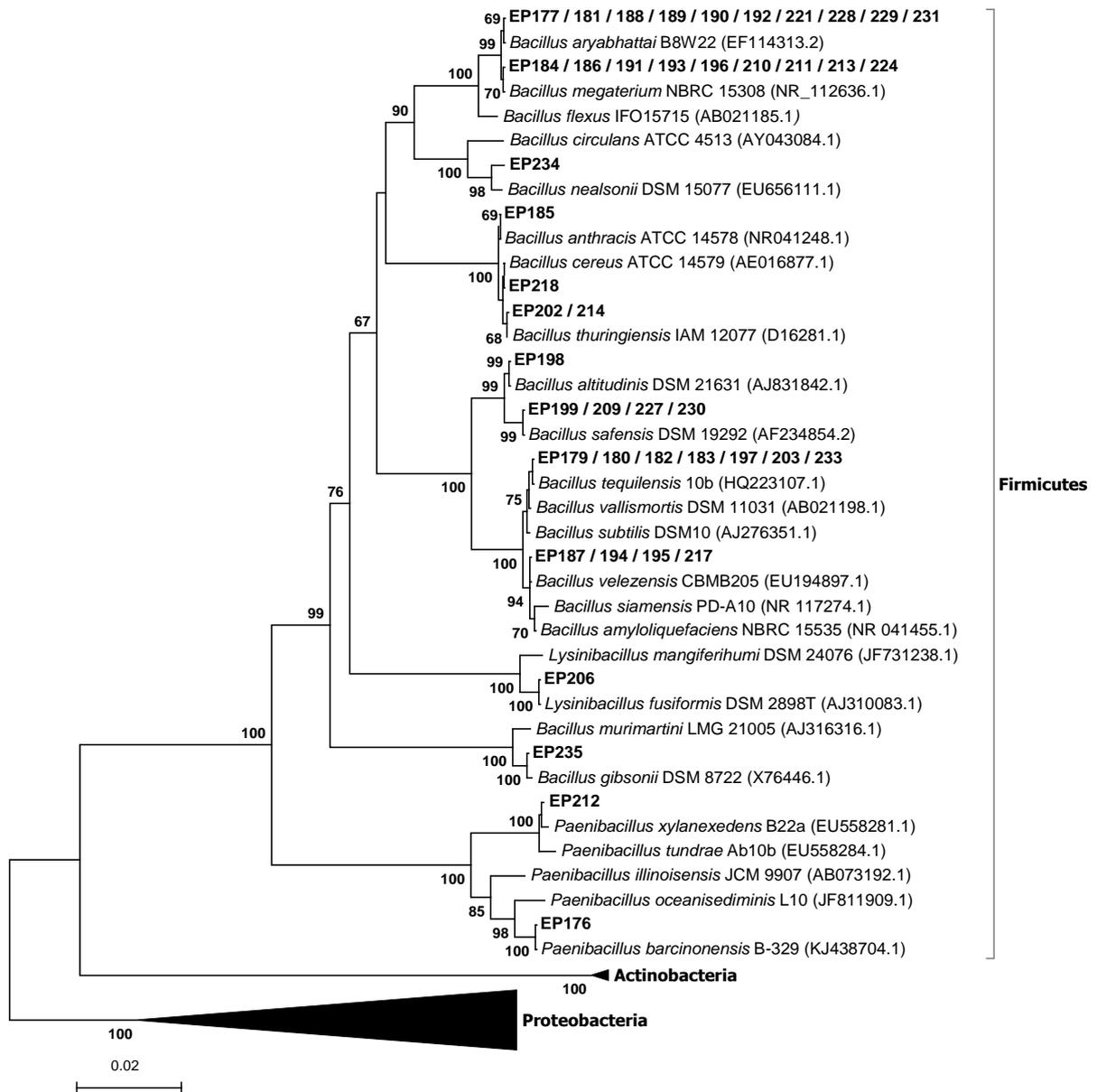


Figura 8a. Árvore filogenética Neighbour-Joining baseada nas sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S dos isolados que compõem a comunidade bacteriana endofítica recuperada de *P. incarnata*. Valores de *bootstraps* são indicados como porcentagens derivadas de 1000 replicações. Valores inferiores a 65 não foram mostrados. O clado Firmicutes é exibido em detalhes e outros foram reduzidos.

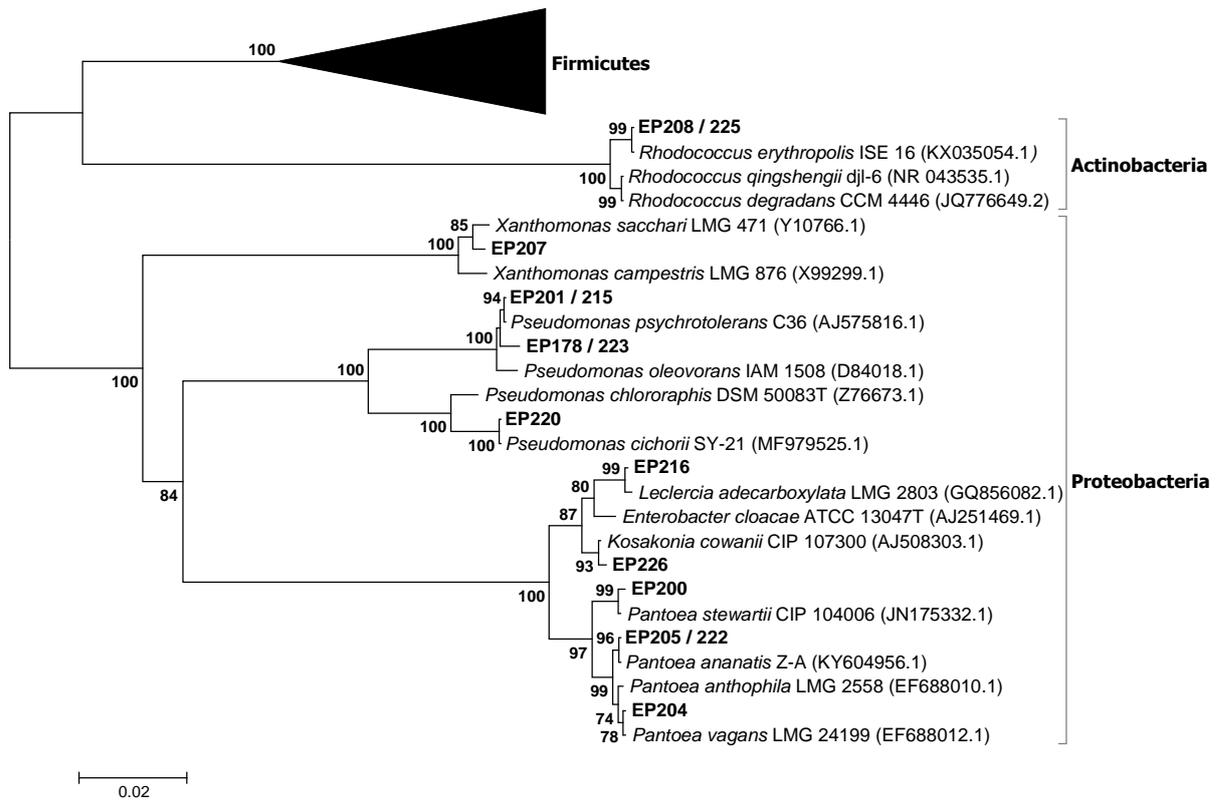


Figura 8b. Árvore filogenética Neighbour-Joining baseada nas sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S dos isolados que compõem a comunidade bacteriana endofítica recuperada de *P. incarnata*. Valores de *bootstraps* são indicados como porcentagens derivadas de 1000 replicações. Valores inferiores a 65 não foram mostrados. O clado para Firmicutes foi reduzido para exibir os filós Actinobacteria e Proteobacteria em detalhe.

A análise filogenética baseada nas sequências do gene RNA ribossomal 16S mostrou que as sequências dos isolados EP178 e EP223 não formaram clados com as sequências das linhagens tipo e como consequência criaram braços filogenéticos separados, sugerindo que poderiam ser novas espécies. Para aprofundar esta hipótese, as sequências foram alinhadas com as oito linhagens tipo mais próximas e as relações filogenéticas reconstruídas a fim de melhorar a resolução da análise prévia (Figura 9). A topologia da árvore mostrou a formação de dois cluster de *Pseudomonas* e a linhagem *Azorhizophilus paspali* NBRC 102228 utilizada como grupo externo. As sequências dos isolados EP178 e EP223 pertencem ao cluster que inclui as linhagens tipo *Pseudomonas oleovorans* IAM 1508, *Pseudomonas oryzihabitans* NBRC 102199 e *Pseudomonas psychrotolerans* C36, porém não formaram clados com nenhuma das linhagens tipo consideradas, e se mantiveram formando um braço isolado apoiado por um valor

número de OTUs. Especificamente, na avaliação da riqueza de espécies, o valor do índice de Chao1 a 99% foi amplamente maior que a 97% e 95%, provavelmente porque a 99% de similaridade se detectaram até 14 OTUs representados só por uma sequência. As espécies (OTUs) representadas por só um indivíduo (sequência) são consideradas como raras. No cálculo da riqueza, as espécies raras têm maior peso estatístico comparado as espécies comuns, contribuindo mais para o valor do índice de riqueza (Chao1). Por outro lado, ao calcular o índice de diversidade (Shannon-Weaver) a espécies raras têm menor valor proporcional.

Tabela 5. Índices de diversidade e riqueza obtidos a partir das sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S.

Similaridade	Diversidade (Shannon-Weaver)	Riqueza (Chao-1)
99%	2,777 (2,305-2,838)	39,17 (17-54)
97%	1,153 (0,721-1,416)	11 (5-18)
95%	0,982 (0,6474-1,219)	6 (4-9)

Os valores apresentados entres parênteses correspondem aos valores maiores e menores esperados.

A rarefação é uma abordagem estatística que permite comparar amostras com número diferente de indivíduos. Neste estudo, a análise de rarefação relacionou o número de OTUs observados (em diferentes níveis de similaridade) e o tamanho da mesma amostra (número de sequências). A curva de rarefação montada com OTUs detectados a 99% de similaridade não mostrou saturação para o número de sequências analisadas, uma vez que houve um grande número de OTUs e dos quais a maioria estava representada só por uma sequência (Figura 10). As curvas a 97% e 95% mostraram tendência a atingir o platô, sugerindo que o universo amostral avaliado foi suficiente para cobrir o número de gêneros da comunidade de endófitos de *P. incarnata* na fase vegetativa. No entanto, nas três curvas de rarefação foi possível observar que a comunidade não foi totalmente acessada e, provavelmente, ainda há uma diversidade a ser explorada. O principal motivo pelo qual não se recuperou a diversidade inteira pode estar relacionada mais com as limitações dos métodos microbiológicos de isolamento que com a metodologia de amostragem. Além das condições restritas de isolamento, a purificação pode ser um segundo fator limitante que pode diminuir a possibilidade de recuperar toda a diversidade, uma vez que está etapa é baseada nas características macroscópicas das colônias para separar e selecionar as possíveis espécies bacterianas. Uma estratégia para superar tais limitações é a aplicação de métodos independentes de cultivo que

aumentam a cobertura por meio da detecção de micro-organismos exigentes ou pouco representados (GLOOR et al, 2015; YANG et al, 2017).

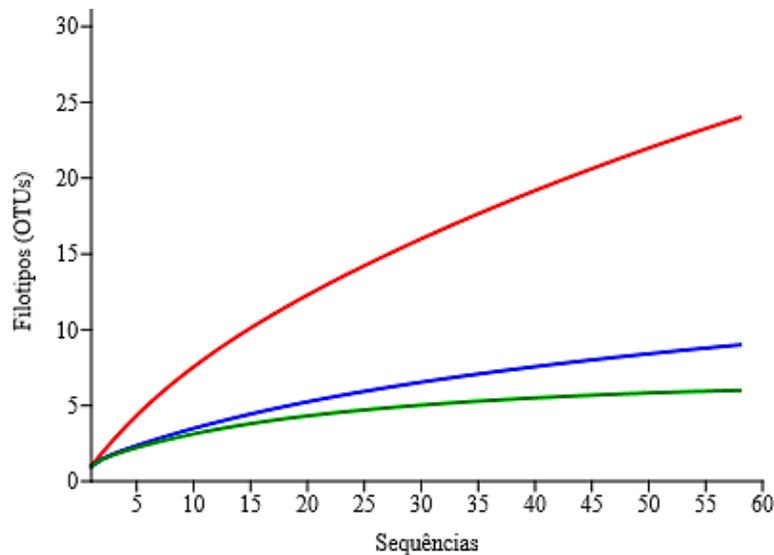


Figura 10. Análise de rarefação das sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S em diferentes níveis de similaridade 99%, 97% e 95%.

5.5 Potencial fenotípico de promoção de crescimento em plantas

5.5.1 Fixação de nitrogênio

Vinte e sete isolados (43,1%) do total da comunidade endofítica recuperada em cultivo foram capazes de crescer no meio semissólido livre de nitrogênio NFb. O crescimento foi avaliado pela formação de um biofilme sob a superfície do meio após duas reinoculações sucessivas que confirmaram o potencial do isolado em fixar o nitrogênio. Os resultados foram mostrados no Apêndice A. Alguns isolados mostraram tendência a crescer em zonas mais profundas do volume do meio (Figura 11). Os isolados EP186, EP189, EP202, EP208, EP218, EP224, EP228 e EP229 atingiram até 15 mm de profundidade durante a formação do biofilme. A nitrogenase, enzima responsável pela fixação biológica do nitrogênio, tem como característica principal atuar em condições de anaerobiose, uma vez que sofre desnaturação na presença de O₂ (DALTON e POSTGATE 1968). Portanto, para que as células bacterianas cresçam em um meio livre de nitrogênio, estas têm que migrar para um ambiente que contenha uma pressão de oxigênio que não afete a estrutura da enzima nitrogenase e suficiente para a respiração aeróbica. A maioria dos isolados (92%) que cresceram no meio NFb foram relacionados ao gênero *Bacillus* (Figura 12). Este gênero bacteriano é conhecido por possuir

representantes que crescem como anaeróbios facultativos, o que explicaria o potencial de crescer nas condições requeridas do aparato fixador de nitrogênio.

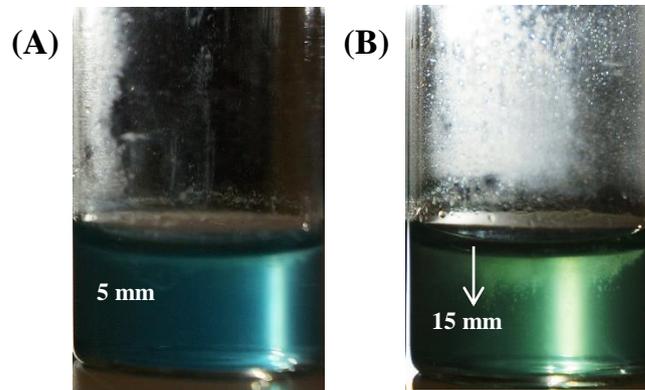


Figura 11. Biofilme bacteriano em meio semissólido NFB indicando a profundidade, e mm, do crescimento bacteriano. (A) Isolado EP182, (B) isolado EP229

Bacillus, como mencionado, foi o gênero com maior número de representantes com potencial para fixar o nitrogênio (25/27), seguido apenas por dois outros isolados do gênero *Rhodococcus* (*R. erythropolis* EP208, EP225). Dentro do gênero *Bacillus*, o filotipo mais abundante capaz de fixar N₂ foi associado a *B. aryabhatai* (9/24), seguido por *B. megaterium* (7/24), *B. tequilensis* (3/24), *B. thuringiensis* (2/24), *B. anthracis*, *B. velezensis* e *B. cereus* (1/24) (Figura 12). Especificamente, os nove isolados de *B. aryabhatai* com potencial para fixar o nitrogênio atmosférico representam 90 % da ocorrência deste filotipo na comunidade, enquanto os sete isolados de *B. megaterium* positivos ao ensaio representam 78%. Um estudo conduzido por Castellano-Hinojosa et al (2016) comprovou a capacidade de fixar o nitrogênio em linhagens de *B. aryabhatai* e *B. megaterium* isoladas da rizosfera de *Lolium perene*. Por outro lado, os 25 isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* que cresceram no meio NFB representam 61% do total de *Bacillus* na comunidade endofítica recuperada neste estudo. Diversos estudos já reportaram o grande potencial do gênero *Bacillus* como fonte de organismos diazotróficos (DING et al 2005; HONGRITTIPUN et al, 2014). Apesar da maioria dos estudos anteriormente mencionados relatar o isolamento de bactérias diazotróficas da rizosfera, existem trabalhos que reportam o potencial diazotrófico de bactérias que residem nos tecidos internos da folha e inclusive na filosfera (MURTY,1984; PATI e CHANDRA,1993; DESGARENNES et al, 2014).

O crescimento no meio NFB só permite testar o potencial do micro-organismo para fixar o nitrogênio. A capacidade diazotrófica, pode ser confirmada pelo ensaio de redução de

etileno, o qual avalia a atividade da enzima nitrogenase (DAVID et al; 1980). Além disso, a detecção do gene *nifH* pode confirmar a presença parcial ou inteira do sistema fixador de nitrogênio.

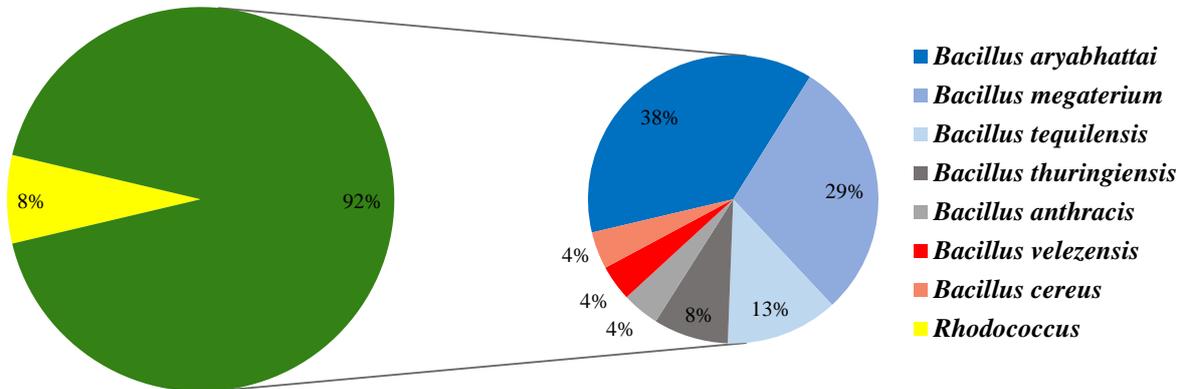


Figura 12. Distribuição dos gêneros e espécies bacterianas endofíticas com potencial de fixação de nitrogênio indicado pelo ensaio em meio semissólido livre de nitrogênio NFb.

5.5.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Dos cinquenta e oito isolados bacterianos, trinta e três (59,9%) mostraram capacidade para solubilizar fosfato inorgânico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ no meio sólido NBRIP. Foram consideradas positivas ao teste, as bactérias que cresceram formando um halo de solubilização ao redor da colônia.

Bacillus foi o gênero com mais representantes positivos para o ensaio de solubilização de fosfato (18/33), seguido por *Pseudomonas* (5/33) e *Pantoea* (4/33). Todos os representantes dos gêneros *Pantoea* e *Pseudomonas* da comunidade endofítica recuperada de *P. incarnata* solubilizaram fosfato no ensaio em meio NBRIP (Figura 13). Um estudo revelou que o mecanismo principal das espécies de *Pantoea* para solubilizar o fosfato inorgânico é a secreção de ácido glucônico (CASTAGNO et al, 2011). Além disso, espécies de *Pseudomonas* secretavam ácidos orgânicos (ácido glucônico, ácido tartárico e outros) como mecanismo para converter o fosfato insolúvel em orto-fosfato disponível para absorção e utilização da planta (PARK et al 2009, OTEINO et al, 2015).

Quando avaliado em nível de espécie, *B. aryabhatai* foi o filotipo mais frequente com potencial para solubilizar fosfato inorgânico (6/33), seguido por *B. megaterium* (4/33), *B. tequilensis* (4/33), *P. psychrotolerans* (2/33), *Pseudomonas* sp. (2/33) e *Pantoea ananatis* (2/33). Os demais filotipos só tiveram um representante capaz de solubilizar o fosfato.

Resultados semelhantes em estudos prévios reportaram o potencial de linhagens de *B. aryabhatai* (LIU et al, 2016), *B. megaterium* (WYCISZKIEWICZ et al, 2017), e *P. psychrotolerans* (FITRIYANTI et al, 2017) para solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*.

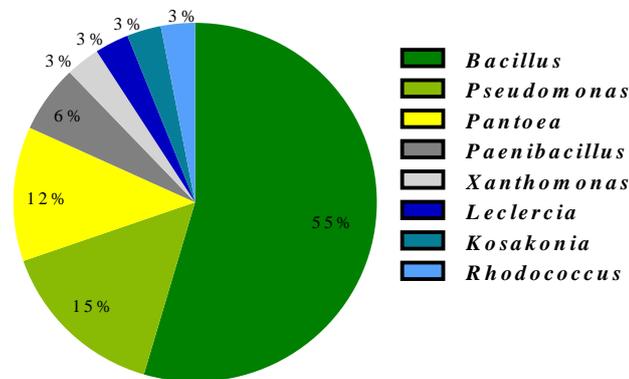


Figura 13. Distribuição de gêneros bacterianos endofíticos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico indicado pelo ensaio em meio sólido NBRIP.

Com fins quantitativos foi calculado o índice de solubilização de fosfato para os isolados que formaram halo. A partir do cálculo do ISF, os isolados positivos ao teste se agruparam de acordo com SILVA FILHO e VIDOR (2000), em bactérias com baixo potencial de solubilização ($ISF < 2$), com médio potencial de solubilização ($2 < ISF < 3$) e com alto potencial de solubilização ($ISF > 3$). Os valores de ISF para cada isolado são mostrados no Apêndice A. *Pseudomonas* foi o gênero com maior número de representantes no grupo com alto potencial de solubilização com uma média de 3,31. O isolado EP223, pertencente ao filotipo *Pseudomonas* sp., apresentou o maior valor de $ISF = 3,53$. Este valor foi maior quando comparado ao ISF calculado para as linhagens *Pseudomonas* sp. TPSB22 (PAUL e SINHA, 2013) e *P. aeruginosa* KUPSB12 (PAUL e SINHA, 2017) descritas na literatura. A maioria dos isolados positivos ao teste de solubilização apresentou potencial médio, representada principalmente por isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*. Nenhum dos isolados positivos ao teste foi incluído no grupo com baixo potencial de solubilização de fosfato (Figura 14).

Dependendo do mecanismo de solubilização do micro-organismo, o meio de cultura pode afetar a taxa de solubilização (NAUTIYAL, 1999), desde que mudanças nos ingredientes que compõem o meio podem alterar o metabolismo microbiano. A solubilização de compostos inorgânicos fosfatados se dá principalmente por meio da secreção de ácidos orgânicos. Inclusive, alguns estudos reportaram bactérias que não apresentaram halo de solubilização no meio sólido, mas solubilizavam fosfatos em meio líquido (LOUW e WEBLEY, 1959;

LEYVAL e BARTHELIN, 1989). Assim, as limitações do ensaio em meio sólido podem estar relacionadas às diferentes taxas de redução de diferentes ácidos orgânicos secretados por um micro-organismo (JOHNSTON, 1952).

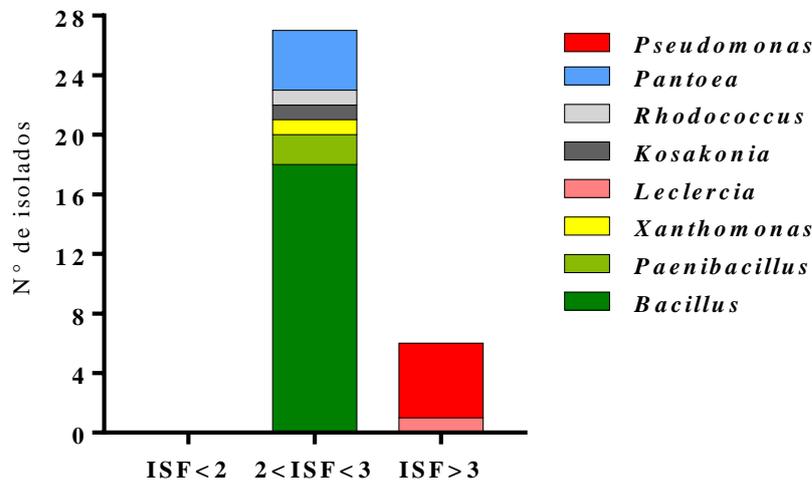


Figura 14. Classificação dos gêneros bacterianos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico de acordo com Silva Filho e Vidor (2000).

5.5.3 Produção de ácido indol acético (AIA)

Dos 58 isolados avaliados para produção de AIA, 44 (75,9%) produziram ácido indol acético ou substâncias similares ao AIA. Os resultados foram detalhados no Apêndice A. O teste colorimétrico usando o reagente de Salkowski não é totalmente específico para detectar AIA, uma vez que não permite a diferenciação entre ácido indol acético (AIA), ácido indol pirúvico (AIP) e indol-3-acetamida (IAM). A deficiência no poder de resolução do ensaio se deve ao fato destas substâncias serem detectadas em um espectro de absorção muito próximo (GLICKMANN e DESSAUX, 1995).

Os valores de produção de AIA variam entre 1,01 e 6,04 $\mu\text{g/mL}$. Os fatores que podem determinar variações na produção de AIA pelos micro-organismos incluem: as condições do meio de cultivo, a fase de crescimento do micro-organismo e a disponibilidade de substratos (FRANKENBERGER e ARSHAD, 1995). O ensaio foi realizado nas mesmas condições para todos os isolados da comunidade endofítica recuperada, sem levar em conta a ampla diversidade recuperada, pois com a representação de quatro filos bacterianos, a possibilidade de oferecer as condições específicas que cada espécie requer para produzir a maior quantidade de AIA diminuía substancialmente. Por outro lado, a adição de triptofano no

meio de cultura pode aumentar a quantidade de AIA produzida, independente da via de síntese de AIA (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1991; SARWAR e FRANKENBERGER, 1994).

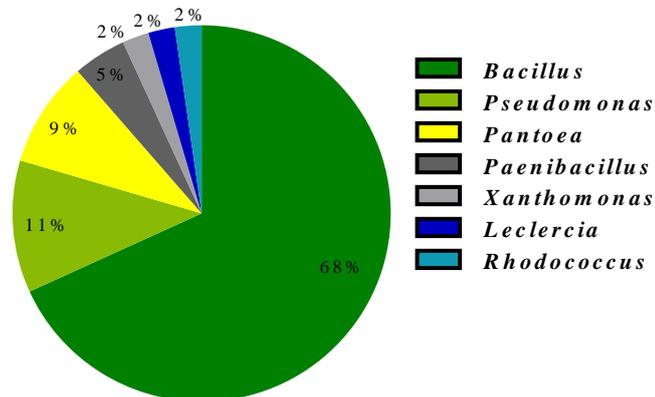


Figura 15. Distribuição de gêneros bacterianos endofíticos com capacidade para produzir ácido indol acético ou similares (AIA).

O gênero bacteriano com maior número de representantes positivos no ensaio de produção de AIA foi *Bacillus* (30/44), seguido por *Pseudomonas* (5/44), *Pantoea* (4/44) e *Paenibacillus* (2/44). Os gêneros *Xanthomonas*, *Leclercia* e *Rhodococcus* juntos somaram só o 6% (3/44) (Figura 15). A pouca representatividade destes três gêneros na população produtora de AIA pode estar relacionada com sua baixa ocorrência (só um isolado por gênero) na comunidade estudada. *Paenibacillus* apresentou a meia mais alta de produção de AIA (5,35 µg/ml). Estudos prévios reportaram o potencial de espécies de *Paenibacillus* como produtores de AIA e outros compostos fenólicos e indólicos (LEBUHN et al, 1997; ASWATHY et al 2013; XIN et al, 2017). Além disso, um estudo a nível genômico, a partir de várias espécies de *Paenibacillus*, determinou que estas utilizam a via IPA para sintetizar AIA (XIE et al, 2016).

Por outro lado, *Bacillus* foi o gênero que apresentou a maior variação de produção de AIA entre seus representantes com valores que vão de 1,01 a 6,04 µg/ml (Figura 16). Um estudo conduzido por SHIM et al (2015) encontrou valores similares de produção de AIA durante as 60 h de incubação de uma linhagem de *Bacillus sp.* JH 2-2. Além disso, outro estudo encontrou valores muito próximos aos nossos, quando avaliou a produção de AIA de várias linhagens de *B. megaterium* em meio suplementado com triptofano (SRINIVASAN et al, 1996).

O isolado EP229 pertencente ao filotipo *B. aryabhatai* apresentou o maior valor de produção de AIA frente aos isolados avaliados. Um estudo reportou uma linhagem de *B.*

aryabhatai que produzia altas quantidades de AIA e simultaneamente suprimia a síntese vegetal de IAA (PARK et al, 2017), confirmando o papel crítico que pode ter esta espécie endófito na regulação do crescimento vegetativo.

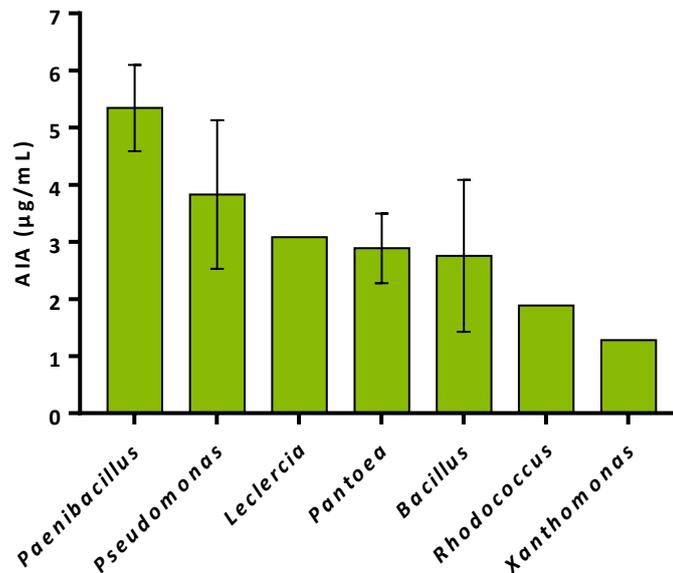


Figura 16. Produção média de AIA obtida por representantes dos gêneros endofíticos.

5.5.4 Produção de sideróforos

No último ensaio fenotípico foram avaliados 58 isolados bacterianos quanto à produção de sideróforos. Destes, quarenta e cinco (77,6%) formaram halos laranja ao redor da colônia, indicando que agentes quelantes capazes de capturar o ferro foram secretados. Os sideróforos são moléculas produzidas como resposta a condições de estresse de ferro. No meio Azul-CAS, o ferro é sequestrado no complexo CAS-Fe (III)-HDTMA dando uma coloração azul ao meio. Se o micro-organismo produz sideróforos, estes são secretados no meio e capturam o ferro, desarmando o complexo e alterando a coloração do meio de azul para uma coloração laranja na zona onde estas moléculas estão difundidas. A coloração da zona de secreção de sideróforos pode ter uma relação com o tipo de sideróforo. Segundo Pérez-Miranda et al (2007), a coloração roxa corresponde a sideróforos do tipo catecol, a coloração laranja a sideróforos do tipo hidroxamato, a coloração laranja-avermelhada a sideróforos dos tipos hidroxamato e catecolato, a coloração laranja pálida a sideróforos dos tipos hidroxamato e carboxilato, e finalmente encontraram uma coloração amarela que não foi possível correlacionar a nenhum tipo de sideróforo. Neste estudo, a maioria dos isolados produziu

coloração laranja avermelhada na zona de secreção de sideróforos, sugerindo que os isolados estariam sintetizando e secretando sideróforos dos tipos hidroxamato e catecolato. Só os isolados EP194, EP195 e EP217 (identificados como *B. velezensis*) produziram halos de cor amarelo. Os fatores que podem alterar a produção de sideróforos incluem: a fonte de carbono e o tipo de aminoácido usado no meio de cultura e a fase de crescimento do micro-organismo (ZHU et al, 2015).

O Chrome Azurol S é um detergente tóxico para os micro-organismos, porém afeta principalmente as bactérias Gram +, pois as Gram - são protegidas parcialmente por sua dupla membrana. Considerando que a comunidade foi predominantemente composta por bactérias Gram+, foram usados discos de papel filtro para evitar o contato direto com o meio (HUSSEIN e JOO, 2014), visando o crescimento bacteriano e a avaliação quanto à produção de sideróforos.

O gênero mais abundante no teste de produção de sideróforos foi *Bacillus* (32/45), seguido por *Pseudomonas* (5/45) e *Pantoea* (4/45). Membros de *Xanthomonas*, *Leclercia*, *Rhodococcus* e *Kosakonia* apenas corresponderiam a 8% da população produtora de sideróforos (Figura 17). Um estudo determinou que várias espécies de *Bacillus* produzem catecol e silicato (ambos catecolatos) (KESAULYA et al, 2018). Entretanto se descobriu que *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* produzem outro tipo de catecolato chamado Bacillibactin (WILSON et al, 2006), mas algumas espécies de *Bacillus* também são capazes de sintetizar sideróforo do tipo hidroxamato como o Schizokinen (STOREY et al, 2006), que inicialmente foi identificado como um fator de divisão celular em *B. megaterium* (BYERS et al, 1967). Porém os hidroxamatos são sideróforos que ocorrem mais comumente em espécies de *Pseudomonas* (ex. Pioverdina) (MEYER e HORNSPERGER, 1978).

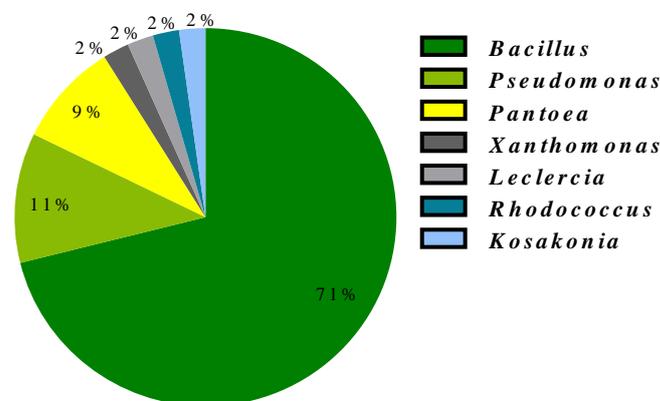


Figura 17. Distribuição dos gêneros bacterianos com capacidade para produzir sideróforos.

O IPS permitiu quantificar parcialmente e comparar a produção de sideróforos entre os isolados. Os valores de IPS para cada isolado estão expostos no Apêndice A. A média do IPS (2,97) entre os membros de *Pseudomonas* foi maior em comparação aos outros gêneros (Figura 18). *Pantoea* foi o gênero que mostrou maior variação do IPS (1,46 a 2,95) entre seus representantes. Um estudo demonstrou o potencial que tinham várias linhagens de *Pseudomonas* para produzir altas quantidades de sideróforos *in vitro* e conseqüentemente melhoraram a absorção de ferro *in vivo* (DÍAZ DE VILLEGAS et al, 2011).

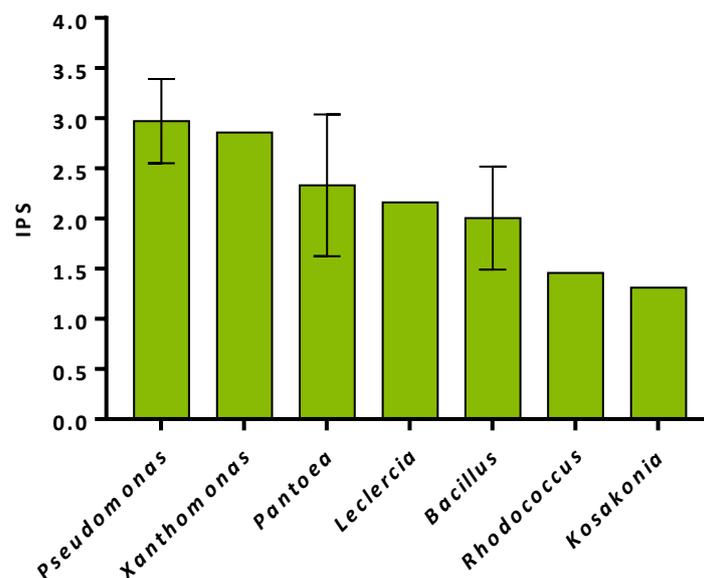


Figura 18. Médias dos valores de IPS dos gêneros endofíticos com capacidade para produzir sideróforos.

5.6 Potencial genotípico de promoção de crescimento vegetal

5.6.1 Amplificação do gene *nifH*

Devido ao crescimento no meio livre de nitrogênio não garantir a capacidade dos isolados bacterianos para fixar o nitrogênio atmosférico, a amplificação do gene *nifH* surge como uma alternativa para confirmar o potencial dos isolados positivos no teste fenotípico ou revelar o potencial genético de isolados que não cresceram no meio NFb. Os resultados encontram-se detalhados no Apêndice B.

Neste estudo os isolados que formaram biofilme no meio NFb não apresentaram produtos de PCR correspondentes ao gene *nifH*. A degeneração dos *primers* pode ter mascarado a sensibilidade do enfoque baseado na PCR, devido à baixa especificidade do *primer* acompanhada de outros fatores da PCR para produzir muitos fragmentos inespecíficos. No

entanto, se detectou a presença do gene *nifH* no isolado EP220 (identificado como *P. cichorii*) (Figura 19), o qual não foi considerado como potencial fixador do nitrogênio pelo teste fenotípico. O fragmento amplificado a partir do DNA genômico do isolado EP220 foi sequenciado para confirmar que se tratava do gene *nifH*. A sequência apresentou 86% de similaridade como o gene *nifH* de uma linhagem de *Insolitispirillum peregrinum* (WP_076398282.1) na análise BLASTX do NCBI. A mesma análise detectou um domínio conservado da superfamília Fer4_NifH. Portanto este resultado seria o primeiro reporte da presença do gene *nifH* no material genômico de uma linhagem de *P. cichorii*. Por outro lado, na análise BLASTN a sequência do isolado EP220 apresentou sua maior similaridade nucleotídica (97%) com uma sequência de um clone (KY121583.1) proveniente de uma biblioteca metagenômica de solo agrícola. Além disso, não apresentou similaridade com sequências depositadas do gênero *Pseudomonas*, o que sugere que o isolado EP220 pode ter adquirido o gene *nifH* por transferência genética horizontal dentro de uma comunidade endofítica associada a plantas.

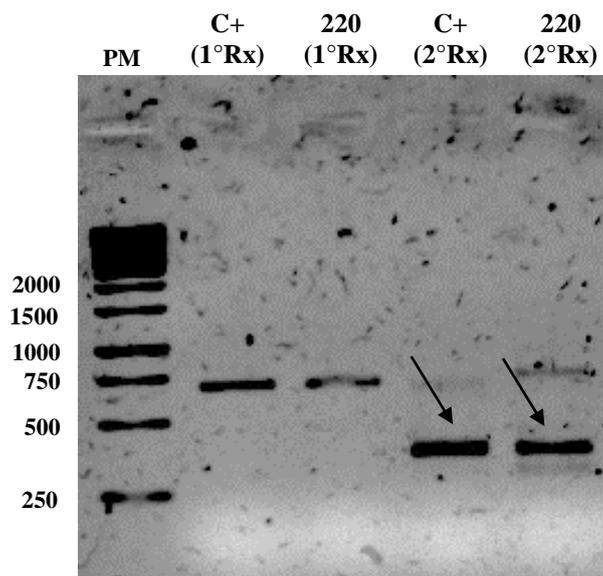


Figura 19. Nested-PCR do gene *nifH* no isolado EP220. Tamanho esperado do produto final (2°Rx): 371 pb. C+: Controle positivo.

5.6.2 Amplificação do gene codificante da fosfatase ácida (*AcPho*)

A busca de um gene marcador para avaliar o potencial de solubilização de fosfatos a partir do principal mecanismo microbiano de solubilização é considerada pouco estratégica, uma vez que este mecanismo envolve a secreção de uma ampla variedade de ácidos orgânicos

produzidos por vias metabólicas que envolvem ainda mais moléculas. Entretanto, utilizar a região genômica que envolve o mecanismo de secreção de enzimas fosfatases pode diminuir e direcionar substancialmente a busca do gene marcador para um único gene. É preciso considerar que as enzimas fosfatases solubilizam fosfatos a partir de fontes orgânicas (SHARMA et al, 2013). Portanto, a abordagem genotípica assume um papel suplementar e não confirmatório ao ensaio no meio NBRIP, onde a solubilização do fosfato se dá a partir de fontes inorgânicas $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Dos 58 isolados testados, em 9 foi detectado o gene *AcPho*. Os resultados da amplificação do gene *AcPho* foram apresentados no Apêndice B. Os fragmentos amplificados (aproximadamente 730 pb) (Figura 20) foram sequenciados com o objetivo de confirmar a sequência correspondentes ao gene *AcPho*. As sequências foram analisadas na plataforma BLATX, onde foram detectados vários domínios conservados (HAD_CAP, COG2503, Acid_phosphat_B) relacionados com a enzima fosfatase ácida. Os *machts* de todas as sequências apresentaram valores de similaridade em torno de 87%. Um estudo similar reportou a presença do gene *AcPho* em bactérias solubilizadoras de fosfatos da ordem Bacilli isoladas de solo de bosques na Índia (LYNGWI et al, 2016).

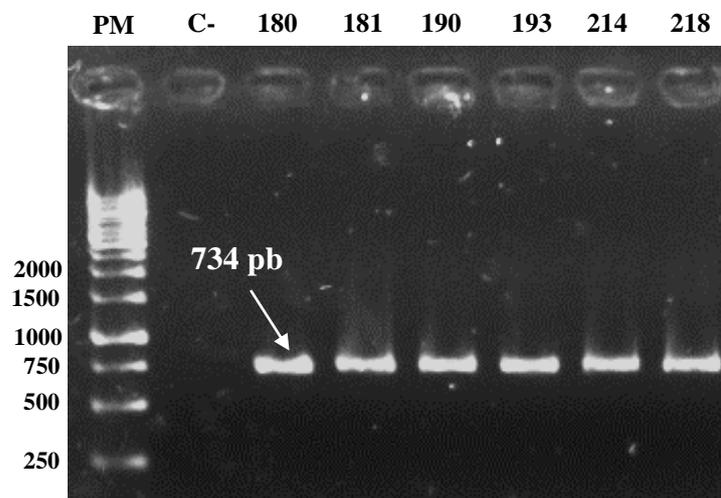


Figura 20. Amplificação do gene *AcPho* em alguns isolados. C-: controle negativo.

Bacillus foi o único gênero cujos membros apresentaram amplificação do gene *AcPho*, provavelmente porque o desenho dos *primers* foi a partir de várias linhagens de *B. thuringiensis* (RADDADI et al, 2008). No entanto, o filotipo mais abundante foi *B. aryabhatai* (3/9) que também foi o mais frequente no ensaio fenotípico de solubilização de fosfatos. Os outros filotipos com representantes que possuíam o gene *AcPho* foram *B. thuringiensis* (2/9),

B. tequilensis (1/9), *B. megaterium* (1/9), *B. anthracis* (1/9) e *B. cereus* (1/9) (Figura 21). Resultados semelhantes ao nosso foram observados por MATOS et al, (2017), o qual demonstrou a atividade da fosfatase ácida em várias espécies de *Bacillus* para solubilizar fosfatos de fontes orgânicas.

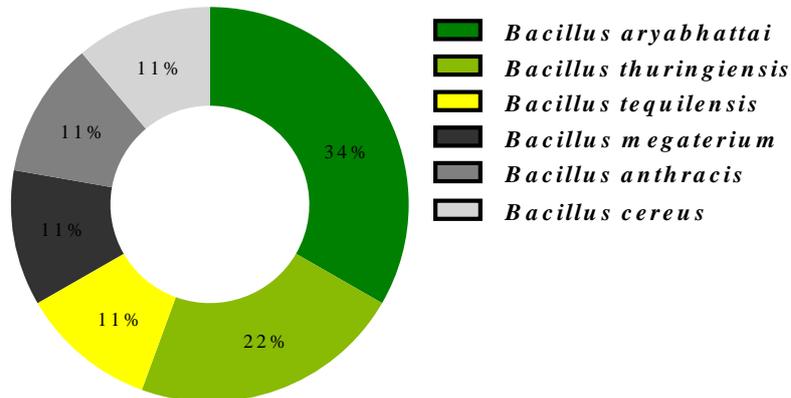


Figura 21. Distribuição de filotipos bacterianos recuperados de *P. incarnata* que carregam o gene *AcPho*.

5.6.3 Amplificação do gene *ipdC*

O gene *ipdC* (codificante da enzima indol piruvato descarboxilase) está envolvido na via de síntese de AIA mais comum entre os endófitos (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011). Portanto seria um ótimo marcador do potencial de síntese de AIA na comunidade endofítica estudada. No entanto, a variação da sequência entre genes ortólogos pode impedir a amplificação do gene, uma vez que os *primers* foram desenhados somente a partir de sequências *ipdC* de linhagens de *B. thuringiensis* e se hibridizam nos extremos 5-UTR e 3-UTR do gene alvo (não necessariamente em regiões conservadas para o gene *ipdC*) (RADDADI et al., 2008).

Dos 58 isolados que compõem a comunidade endofítica cultivável, em 16 (27,6%) foi possível amplificar o gene *ipdC* sob as condições descritas na metodologia (Figura 22). Os resultados foram detalhados no anexo B. Os produtos de PCR que apresentaram o tamanho esperado (aproximadamente 1700 pb) foram sequenciados para confirmar sua relação com o gene codificante da enzima indol piruvato descarboxilase. As sequências foram analisadas no BLASTX e todos os melhores *matches* estavam em torno de 91%. Além disso, os domínios conservados (PDC1, indolpyr_decarb, PLN02573) relacionados com o gene *ipdC* foram detectados em todas as sequências.

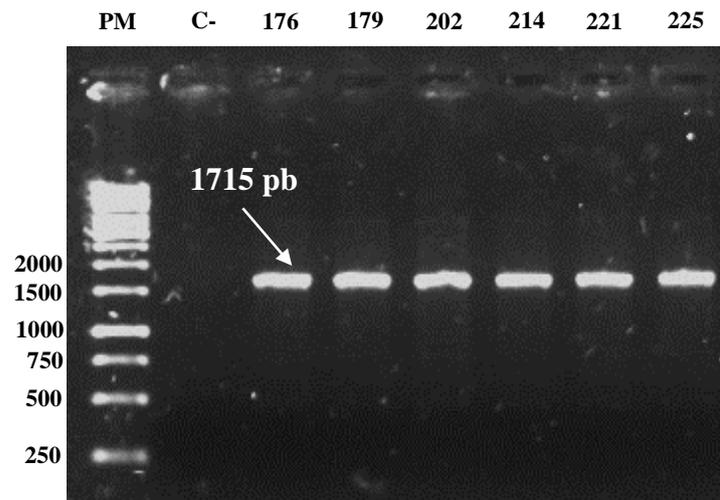


Figura 22. Amplificação do gene *ipdC* em alguns isolados. C-: controle negativo.

A maioria dos isolados onde se detectaram o gene *ipdC* pertenciam ao gênero *Bacillus*. Os gêneros *Rhodococcus* e *Paenibacillus* tiveram apenas um representante cada com potencial genotípico para produzir ácido indol acético (Figura 23). Um estudo conduzido por LYNGWI et al (2016) detectou a presença do gene *ipdC* em espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus* que mostraram sua capacidade *in vitro* para sintetizar AIA. Além disso, outro estudo revelou que extratos vegetais podem induzir a produção de AIA por uma espécie de *Rhodococcus* (VANDEPUTTE et al. 2005), sugerindo que na comunidade endofítica avaliada não só houve produção endofítica de moléculas que beneficiam ao hospedeiro, mas também a regulação da expressão de metabólitos pelos dois componentes do holobionte, permitindo manter a estrutura da comunidade endofítica e o ótimo crescimento da planta.

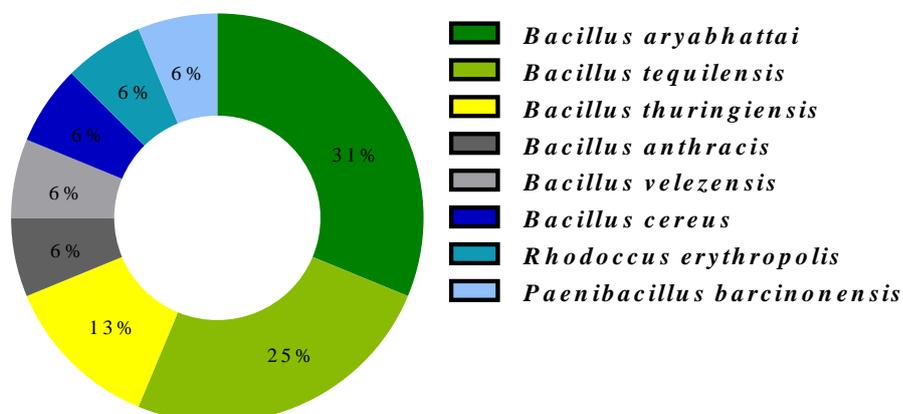


Figura 23. Distribuição de filotipos bacterianos onde foram amplificados o gene *ipdC*.

5.6.4 Amplificação do gene *asb*

A ampla diversidade de tipos de sideróforos classificados por seu sítio de união ao ferro somado a grande variedade de sideróforos de um mesmo tipo produzidos por distintos micro-organismos dificulta a escolha de um gene marcador para avaliar a produção de sideróforos para um enfoque genotípico. O gene *asb* codificante da Petrobactina foi escolhido por ocorrer comumente em espécies de *Bacillus* (KOPPISCH, 2008), portanto poderia ser útil na comunidade estudada composta principalmente por isolados do gênero *Bacillus*. No entanto, o gene *asb* só foi amplificado em 4 isolados: EP185 (*B. anthracis*), EP202 (*B. thuringiensis*), EP214 (*B. thuringiensis*) e EP218 (*B. velezensis*) (Figura 24). Os fragmentos do tamanho esperado (aproximadamente 1700 pb) foram sequenciados para confirmar a relação com sideróforos. As sequências foram analisadas na plataforma BLASTX e os melhores *matches* estavam em torno 95% de similaridade. Além disso, os domínios conservados (Rhbc) relacionados com proteínas de síntese de sideróforos como a Aerobactina foram detectados em todas as sequências (WILLIAMS e CARBONETTI, 1986).

Por outro lado, curiosamente em vários isolados foi amplificado um fragmento inespecífico de aproximadamente 1000 pb (Figura 24). Ao sequenciar este fragmento e analisá-lo pelo BLASTX, se determinou que possuía domínios conservados (*tatA*) relacionados à subunidade TatA/TatE da proteína translocase A. Esta proteína está envolvida no mecanismo de recepção e translocação ao interior da célula de uma reductase do ferro (III) (LECHOWICZ e KRAWCZYK-BALSKA, 2015), portanto está estreitamente relacionada com o metabolismo do ferro extracelular. O fragmento inespecífico foi amplificado em 15 isolados: 6 pertencentes ao filotipo *B. megaterium*, 5 ao filotipo *B. aryabhatai*, 2 ao filotipo *B. velezensis*, 1 ao filotipo *P. xylanaxedens* e 1 ao filotipo *P. cichorii*. Embora não tenha sido amplificada uma sequência nucleotídica relacionada à síntese de sideróforos, houve evidência que estes 15 isolados podem ter participado por outras vias na redução do ferro e, consequentemente, na disponibilização deste íon.

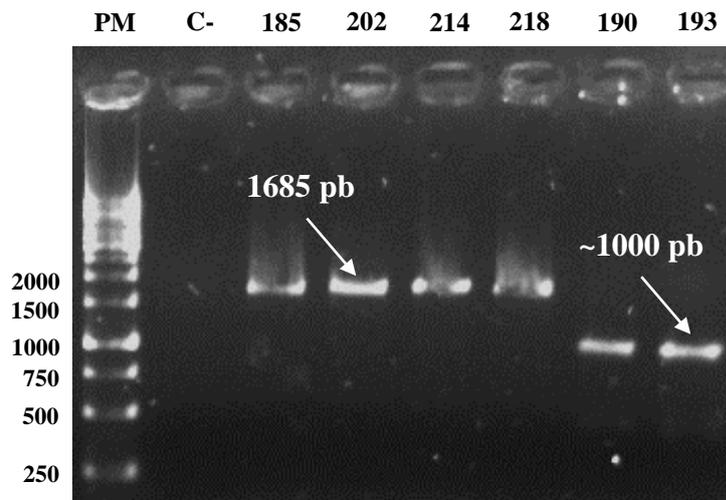


Figura 24. Amplificação do gene *asb* nos isolados EP185, EP202, EP214 e EP218. Amplificação inespecífica nos isolados EP190 e EP193. C-: controle negativo

5.7 Potencial fenotípico e genotípico de promoção de crescimento vegetal

A aplicação das abordagens fenotípica e genotípica, dependendo da característica PCV, permitiu confirmar o potencial atribuído por uma das abordagens, aumentar a cobertura de detecção ou complementar a informação para considerar um determinado isolado como promotor do crescimento vegetal.

Na avaliação da fixação biológica do nitrogênio, o ensaio genotípico baseado na amplificação do gene *nifH* permitiu aumentar a cobertura de detecção, uma vez que o gene *nifH* foi amplificado a partir do material genético de um isolado que não foi considerado potencial fixador de nitrogênio pelo teste fenotípico. No entanto, não se detectou o gene *nifH* em nenhum dos isolados que cresceram no meio livre de nitrogênio. Assim, podemos considerar que estes resultados estão sujeitos as limitações do enfoque PCR e da diversidade recuperada.

Para determinar o potencial de solubilização de fosfatos dos isolados a combinação das abordagens mostrou-se complementar. Na abordagem fenotípica, a formação do halo de solubilização no meio NBRIP indicou que as bactérias usam mecanismo para solubilizar o fosfato inorgânico, a secreção de ácidos orgânicos (NAUTIYAL, 1999). Ao contraste, a amplificação do gene que codifica a enzima fosfatase ácida, na abordagem genotípica, indicou o potencial dos isolados para a solubilizar fosfato orgânico (SHARMA et al, 2013). No entanto, alguns isolados confirmaram seu potencial para solubilizar fosfatos pelos dois mecanismos de solubilização, o que aumentaria consideravelmente seu potencial como bioinoculante de

fertilização. Os isolados EP180 (*B. tequilensis*) e EP189 (*B. aryabhatai*) formaram halos de solubilização no meio suplementado e tiveram o gene *AcPho* amplificado (Figura 25a).

O potencial para sintetizar auxinas foi avaliado pela produção *in vitro* de AIA em um meio suplementado com triptofano e a amplificação do gene *ipdC* (que codifica um intermediário da via IPA), desse modo se pode inferir que os isolados que tenham resultados positivos nos testes fenotípicos e genotípicos produzem AIA pela via IPA. Dos 58 isolados que compõem a comunidade recuperada, 14 foram positivas as duas abordagens os que incluem os filotipos *B. aryabhatai* (5/14), *B. tequilensis* (4/14), *B. anthracis* (1/14), *B. thuringiensis* (1/14), *B. velezensis* (1/14), *P. barcinonensis* e *R. erythropolis* (1/14) (Figura 25b). Portanto, estes isolados estariam usando a via IPA para produzir o AIA. No entanto os micro-organismos podem sintetizar AIA por outras metabólicas como IAM ou IAOx/IAN, as quais podem ocorrer e se expressar juntos com a via IPA (DUCA et al, 2014). A capacidade para produzir AIA foi confirmada pelas duas abordagens, assim, estes endófitos podem ser considerados como potenciais bioinoculantes.

A avaliação do potencial para sintetizar sideróforos foi a través da formação de um halo de secreção de sideróforos no meio Agar Azul-CAS e pela amplificação do gene *asb*. Porém o teste genotípico se limita à detecção de genes com sequência nucleotídica altamente similar ao *asb*. Considerando que existe uma ampla variedade de tipos de sideróforos foi pouco provável detectar isolados que sejam positivas para as duas abordagens. No entanto os isolados EP185 (*B. anthracis*), EP202 (*B. thuringiensis*) e EP218 (*B. cereus*) foram a intersecção para as duas abordagens (Figura 25c). Dos 15 isolados que carregavam no seu material genético sequências relacionadas a uma translocase, 14 produziram halos de secreção de sideróforos e, portanto, foi possível inferir que estes endófitos além de demonstrar a capacidade de sintetizar sideróforos *in vitro* possuem ainda outros componentes envolvidos no metabolismo do Ferro.

Nenhum dos isolados mostrou potencial para solubilizar fosfatos, sintetizar AIA e produzir sideróforos nos ensaios fenotípicos e genotípicos simultaneamente. Entretanto, os isolados EP180 e EP189 apresentaram potencial para produzir AIA e solubilizar fosfatos e os isolados EP185 e EP202 potencial para produzir AIA e sideróforos nas duas abordagens (Figura 25d).

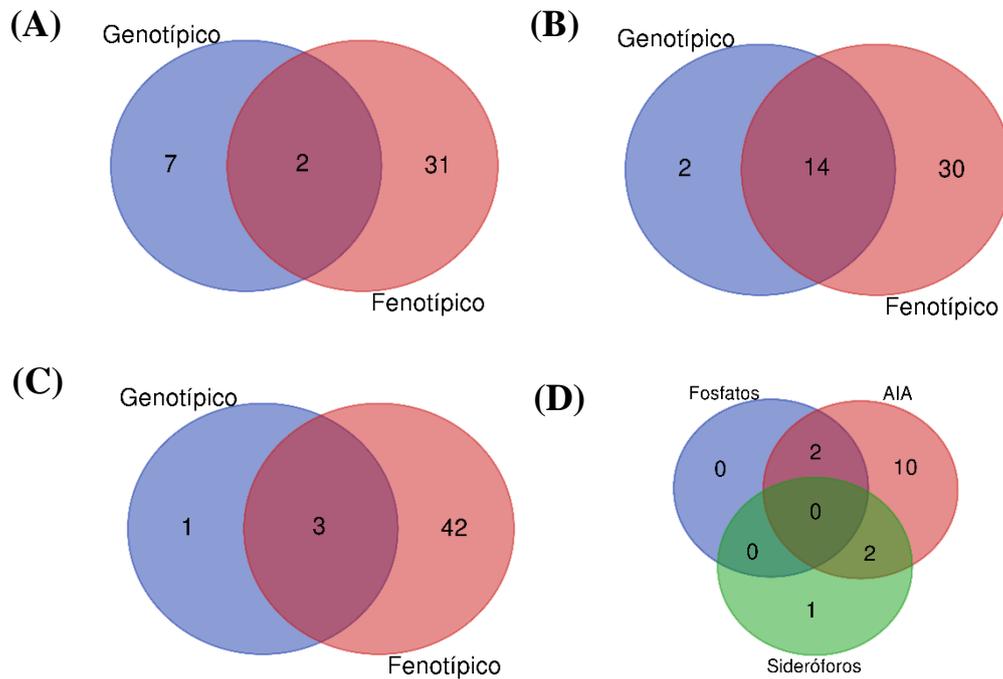


Figura 25. Diagrama de Venn da ocorrência de isolados com potencial fenotípico e genotípico para solubilizar fosfatos (A), sintetizar AIA (B), produzir sideróforos (C) e as três atividades juntas (D).

Quando se analisou a ocorrência das quatro características associadas à PCV dentro da comunidade endofítica, considerando as duas abordagens separadamente, os resultados mostraram que 10 isolados tinham potencial para as 4 atividades de PCV avaliadas, 25 isolados tinham potencial para ao menos 3 atividades de PCV e 54 isolados pelo menos para uma atividade de PCV, isto baseado nos ensaios fenotípicos (Figura 26). No caso da abordagem genotípica, em 4 isolados foram detectados os 3 genes relacionados à PCV e 19 isolados ao menos a um gene relacionado à PCV. (Figura 27).

Finalmente a aplicação das duas abordagens foi realizada com o objetivo de demonstrar a predominância de bactérias endofíticas com potencial de PCV dentro da comunidade bacteriana endofítica associada a *P. incarnata* na sua Fase Vegetativa. A predominância de bactérias benéficas foi comprovada, pois 93,15% (54/58) dos membros da comunidade apresentaram potencial fenotípico para ao menos uma característica relacionada à PCV. Por outro lado, a abordagem genotípica confirmou ou revelou pela primeira vez o potencial de PCV em vários isolados.

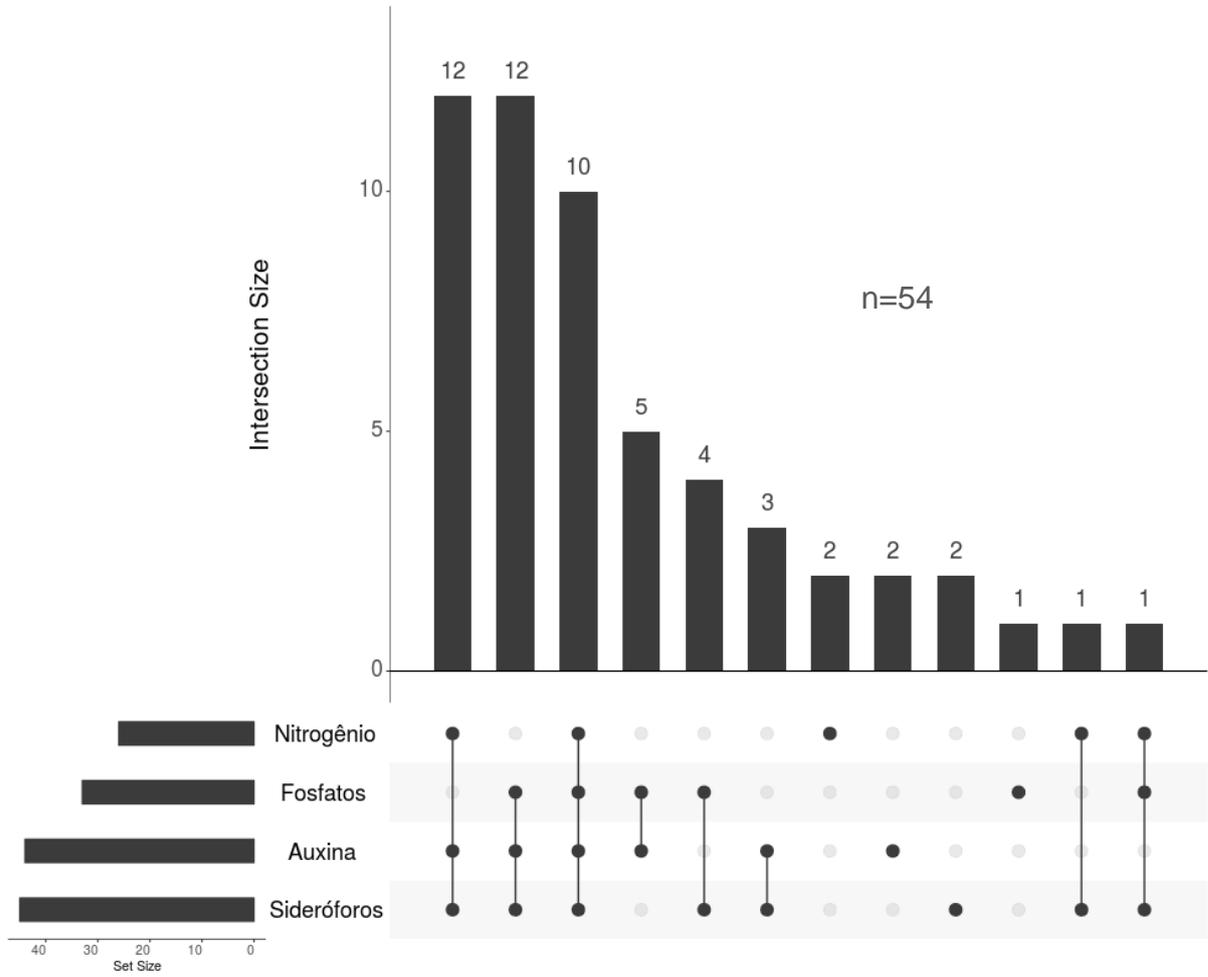


Figura 26. Esquema de intersecção da ocorrência de isolados com potencial fenotípico para promover o crescimento vegetal.

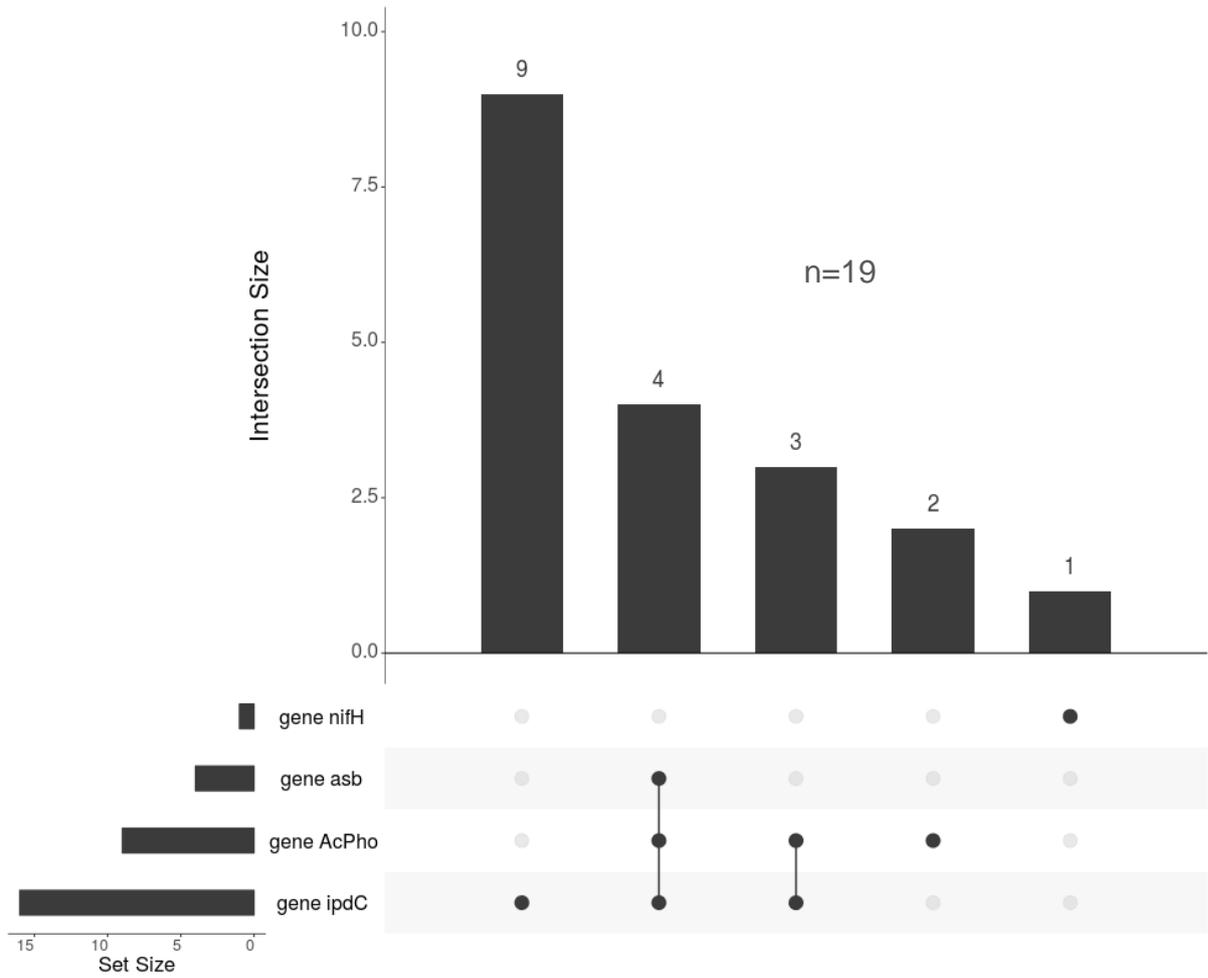


Figura 27. Esquema de intersecção da ocorrência de isolados com potencial genotípico para promover o crescimento vegetal.

6. CONCLUSÕES

- A comunidade bacteriana endofítica cultivável apresentou uma complexa diversidade de genótipos e fenótipos bacterianos.
- A comunidade bacteriana endofítica cultivável foi majoritariamente composta por membros dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* e em nível de espécie por isolados de *B. aryabhattai* e *B. megaterium*.
- Os isolados EP218 e EP288 representam potencialmente a uma nova de espécie de *Pseudomonas*.
- A maioria de isolados e espécies que compõem a comunidade recuperada a partir de *P. incarnata* possuem características relacionadas à promoção de crescimento vegetal, baseado nos resultados dos ensaios fenotípicos e genotípicos.
- A dominância de bactérias benéficas para o hospedeiro vegetal pode estar relacionada com as necessidades nutricionais que ocorrem durante o crescimento vegetativo de *P. incarnata*. Portanto, o *status* fisiológico da planta pode determinar a estrutura e composição da comunidade endofítica.
- Os isolados EP181, EP189, EP212, EP215, EP220, EP221, EP223, EP225, EP229 e EP231 possuem características bioquímicas e genéticas relacionadas à PCV de forma diferenciada que os formam em potenciais candidatos à formulação de bioinoculantes.

7. REFERENCIAS

- AGLER, M. T., RUHE, J., KROLL, S., MORHENN, C., KIM, S.-T., WEIGEL, D., KEMEN, E. M. (2016). Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. *PLoS Biology*, 14(1), e1002352.
- AL-AWADHI, H., DASHTI, N., KHANAFER, M., AL-MAILEM, D., ALI, N., RADWAN, S. (2013). Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: a representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. *SpringerPlus*, 2(1), 369
- ALI, B., SABRI, A.N., LJUNG, K., HASNAIN, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 519–526
- ARSHAD, M., FRANKENBERGER, W.T. (1991). Microbial production of plant hormones. *Plant Soil*, 133, 1.
- ASH, C., FARROW, J.A., DORSCH, M., STACKEBRANDT, E., COLLINS, M.D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*, 41(3), 343-6.
- ASSUMPÇÃO, L. Diversidade da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja e o seu potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 57. 2008
- ASWATHY, A.J., JASIM, B., JYOTHIS, M., RADHAKRISHNAN, E.K. (2013). Identification of two strains of *Paenibacillus* sp. as indole 3 acetic acid-producing rhizome-associated endophytic bacteria from *Curcuma longa*. *3 Biotech*, 3(3), 219-224.
- BALDANI, J.I., REIS, V.M., VIDEIRA, S., BODDEY, L., BALDANI, V.L. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384, 413-431.
- BAR-YOSEF, B., ROGERS, R.D., WOLFRAM, J.H., RICHMAN, E. (1999). Pseudomonas cepacia-mediated rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorillonite suspensions. *Soil Sci Soc Am J*, 63, 1703–1708.
- BARBER, S.A. (1995). Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach, Wiley, New York.

- BENHIZIA Y, BENHIZIA H, BENGUEDOUAR A, MURESU R, GIACOMINI A, SQUARTINI A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst Appl Microbiol*. 2004;27(4):462-8.
- BENNETT, J. S., JOLLEY, K. A., EARLE, S. G., CORTON, C., BENTLEY, S. D., PARKHILL, J., MAIDEN, M. C. J. (2012). A genomic approach to bacterial taxonomy: an examination and proposed reclassification of species within the genus *Neisseria*. *Microbiology*, 158(Pt 6), 1570–1580.
- BJORNBERG, K.E., JONAS, E., MARSTORP, H., TIDAKER, P. (2015). The role of biotechnology in sustainable agriculture: views and perceptions among key factors in the Swedish food supply chain. *Sustainability*, 7(6),7512–7529
- BOTTINI, R., CASSÁN, F. AND PICCOLI, P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 65, 497–503
- BRIGHT, M., BULGHERESI, S. (2010). A complex journey: Transmission of microbial symbionts. *Nat. Rev. Microbiol*, 8, 218–230.
- BUTTERLY, C.R., BUNEMANN, E.K., MCNEILL, A.M., BALDOCK, J.A., MARSCHNER, P. (2009). Carbon pulses but not phosphorus pulses are related to decrease in microbial biomass during repeated drying and rewetting of soils. *Soil Biol Biochem*, 41,1406–1416.
- BYERS, B.R., POWELL, M.V., LANKFORD, C.E. (1967). Iron-chelating Hydroxamic Acid (Schizokinen) Active in Initiation of Cell Division in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*,93(1),286-294.
- CAI, X., KANG, X., XI, H., LIU, C., XUE, Y. Complete Genome Sequence of the Endophytic Biocontrol Strain *Bacillus velezensis* CC09. *Genome Announc*. 2016 ;4(5). pii: e01048-16
- CARROLL, G. (1988) Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69, 2–9.
- CASTAGNO, L.N., ESTRELLA, M.J., SANNAZZARO, A.I., GRASSANO, A.E., RUIZ, O.A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *J Appl Microbiol*,110(5),1151-65.

- CASTELLANO-HINOJOSA, A., CORREA-GALEOTE, D., PALAU, J., BEDMAR, E.J. Isolation of N₂ -fixing rhizobacteria from *Lolium perenne* and evaluating their plant growth promoting traits. *J Basic Microbiol*,56(1),85-91.
- CAVALCANTE, V.A., DÖBEREINER, J. (1988). A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*,108(1),23-31.
- CHOU, H.M., BUNDOCK, N., ROLFE, S.A., SCHOLLES, J.D. (2000). Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol Plant Pathol*,1(2),99–113.
- CLARRIDGE III, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev*, 17, 840–862.
- COMPANT, S., CLEMENT, C., SESSITSCH, A. (2010). Plant Growth-Promoting Bacteria in the Rhizo- and Endosphere of Plants: Their Role, Colonization, Mechanism Involved and Prospects for Utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.
- COMPANT, S., REITER, B., SESSITSCH, A., NOWAK, J., CLÉMENT, C., AIT BARKA, E., (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium. *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71,1685e1693.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C. AND SESSITSCH, A. (2010) Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42, 669–678.
- DALTON, H., POSTGATE, J.R. (1968). Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol*, 54,463–473.
- DAS, S., DASH, H.R., MANGWANI, N., CHAKRABORTY, J., KUMARI, S. (2014) Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods*, 103, 80-100.
- DAVID, K.A.V., APTE, S.K., BANERJI, A., THOMAS, J. (1980). Acetylene Reduction Assay for Nitrogenase Activity: Gas Chromatographic Determination of Ethylene Per Sample in Less Than One Minute. *Applied and Environmental Microbiology*,39(5),1078-1080.

- DE BARY, H.A. (1884). Vergleichende morphologie und biologie der pilze mycetozen und bacterien. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- DESGARENES, D., GARRIDO, E., TORRES-GOMEZ, M.J., PEÑA-CABRIALES, J.J., PARTIDA-MARTINEZ, L.P. (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated Agave species. *FEMS Microbiol Ecol*, 90(3),844-57.
- DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A. (2004). Passiflora: a review update. *J Ethnopharmacol*,94(1),1-23.
- DUCA, D., LORV, J., PATTEN, C.L., ROSE, D., GLICK, B.R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*,106(1),85-125.
- DURBAK, A., YAO, H., MCSTEEN, P. (2012) Hormone signaling in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol*, 15, 92–96.
- DUTKIEWICZ, J., MACKIEWICZ, B., KINGA LEMIESZEK, M., GOLEC, M., MILANOWSKI, J. (2016). Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Ann Agric Environ Med*,23(2):197-205.
- EEVERS, N., GIELEN, M., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A., JASPERS, S., WHITE, J. C., VANGRONSVELD, J., WEYENS, N. (2015). Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial Biotechnology*, 8(4), 707–715.
- FARRAR, K., BRYANT, D., COPE-SELBY, N. (2014). Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal*, 12(9),1193-1206.
- FITRIYANTI, D., MUBARIK, N.R., TJAHOLEKSONO, A. (2017). Characterization of phosphate solubilizing bacteria and nitrogen fixing bacteria from limestone mining region. *Malaysian Journal of Microbiology*,13(3),147-55.
- FRANK, A.C., SALDIERNA-GUZMÁN. J.P., SHAY, J.E. (2017) Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms*,5(4),70.
- FRANKENBERGER, W.T. JR., ARSHAD, M. (1995). Phytohormones in soils: microbial production and function. New York: Marcel Dekker, Inc, 5–40

- FUENTES, V., LEMES, C., RODRÍGUEZ, C. (2000). Instructivo Técnico del cultivo de *Passiflora Incarnata* L. *Rev Cubana Plant Med*, 5 (3),118-122.
- GALLOWAY, J.N., TOWNSEND, A.R., ERISMAN, J.W., BEKUNDA, M., CAI, Z., FRENEY, J.R., MARTINELLI, L.A., SEITINGER, S.P., SUTON, M.A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*,320(5878):889-892.
- GARDENER, B.B.M. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*, 94,11, 1252-1258.
- GLOOR, G. B., HUMMELEN, R., MACKLAIM, J. M., DICKSON, R. J., FERNANDES, A. D., MACPHEE, R., REID, G. (2010). Microbiome Profiling by Illumina Sequencing of Combinatorial Sequence-Tagged PCR Products. *PLoS ONE*, 5(10), e15406.
- GREENWOOD, N.N., EARNSHAW, A. (1997). *Chemistry of the Elements*. 2nd ed. Oxford: Buterworth Heinemann.
- HALLMANN, J. (2001). Plant interactions with endophytic bacteria. In: Jeger, M.J., Spence, N.J. (Eds.), *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations*. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, 87-119.
- HARDOIM, P.R., VAN OVERBEEK, L.S., ELSAS, J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol*,16(10),463-71.
- HERRE, E.A., KNOWLTON, N., MUELLER, U.G., REHNER, S.A. (1999). The evolution of mutualisms: Exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol*, 14, 49–53.
- HONGRITTIPUN, P., YOUPENSUK, S., RERKASEM, B. (2014). Screening of Nitrogen Fixing Endophytic Bacteria in *Oryza sativa* L. *Journal of Agricultural Science*,6(6), 1916-9760.
- HUSSEIN, K.A., JOO, J.H. (2014). Potential of Siderophore Production by Bacteria Isolated from Heavy Metal: Polluted and Rhizosphere Soils. *Curr Microbiol*, 68, 717.
- JAMES, E.K., GYANESHWAR, P., MANTHAN, N., BARRAQUIO, W.L., REDDY, P.M., IANETTA, P.P.M., OLIVARES, F.L., LADHA, J.K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 894e906.

- JAMESON, P.E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions - An overview. *Plant Growth Reg*, 32,369–380.
- JOHNSTON, H.W. (1952). The solubilization of phosphate: the action of various organic compounds on dicalcium and tricalcium phosphate. *New Zealand J. Sci. Technol*, 33, 436-444.
- KANDEL, S.L., JOUBERT, P.M., DOTY, S.L. (2017). Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*,5(4),77.
- KESAULYA, H., HASINU, J.V., TUHUMURY, G.N.C. (2018). Potential of *Bacillus* spp produces siderophores in suppressing the wilt disease of banana plants. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci*, 102, 012016
- KHAN, A.A., JILANI, G., AKHTAR, M.S., NAQVI, S.M.S., RASHEED, M. (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J Agric Biol Sci*, 1(1),48–58.
- KHAN, M.S., ZAIDI, A., AHMED, M., OVES, M., WANI, P.A. (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch Agron Soil Sci*, 56, 73–98.
- KHAN, M.S., ZAIDI, A., WANI, P.A. “Role of phosphatesolubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review,” *Agronomy for Sustainable Development*, 27(1),29–43.
- KIM, K.Y., MC DONALD, G.A., JORDAN, D. (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biol Fertil Soils*, 24,347–352
- KIM, M., LIM H.S., LEE H.H., KIM T.H. (2017). Role Identification of *Passiflora Incarnata* Linnaeus: A Mini Review. *Journal of Menopausal Medicine*, 23(3),156-159.
- KONSTANTINIDIS, K.T., ROSSELLÓ-MÓRA, R., AMANN, R. (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *ISME J*,11(11),2399-2406.
- LANKFORD, C.E. (1973). Bacterial assimilation of iron. *Crit Rev Microbiol*,2,273-331.
- LEBEIS, S.L. (2015). Greater than the sum of their parts: characterizing plant microbiomes at the community-level. *Curr Opin Plant Biol*,24,82-6.

- LEBUHN, M., HEULIN, T., HARTMANN, A. (1997). Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*,22(4),325–334.
- LEGHARI, S.J., WAHOCHO, N.A., LAGHARI, G.M., LAGHARI, A.H., BHABHAN, G.M., TALPUR, K.A., BHUTO, T.A., WAHOCHO, S.A., LASHARI, A.A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*,10(9),209-219
- LEYVAL, C., BARTHELIN, J. (1989). Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg and Fe mobilization from mineral and plant growth. *Plant Soil*, 17, 103-110.
- LIU, M., LIU, X., CHENG, B., MA, X., LYU, X., ZHAO, X., JU, Y., MIN, Z., ZHANG, Z., FANG, Y. (2016). Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(4), e1106.
- LOUW, H.A., WEBLEY, D.M. (1959). A study of soil bacteria dissolving certain phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bacteriol*,22, 227-233.
- MAIGNIEN, L., DEFORCE, E.A., CHAFEE, M.E., EREN, A.M., SIMMONS, S.L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *MBio*,5(1), e00682-13.
- MALERBO-SOUZA, D.T.; RIBEIRO, M. F. (2010). Polinização do maracujá doce (*Passiflora alata* Dryander). *Scientia Agraria Paranaensis*. 99(2),37 - 46
- MALIHA, R., SAMINA, K., NAJMA, A., SADIA, A., FAROOQ, L. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. *Pak J Biol Sci*, 7,187–196.
- MATOS, A.D.M, GOMES, I.C.P., NIETSCHKE, S., XAVIER, A.A., GOMES, W.S., DOS SANTOS NETO J.A., PEREIRA, M.C.T. (2017). Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *An. Acad. Bras. Cienc*,89 (4), 2945-2954.
- MCGILL, W.B., COLE, C.V. (1981). Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma*, 26,267–268.

- MEYER, J.M., HORNSPERGER, J.M. (1978). Role of pyoverdine, the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport. *J. Gen. Microbiol*, 107, 329–331.
- MURTY MG. (1984). Phyllosphere of Cotton as a Habitat for Diazotrophic Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol*, 48(4), 713-718.
- NANNIPIERI, P., GIAGNONI, L., LANDI, L., RENELLA, G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bunemann E, Oberson A, Frossard E (eds) *Phosphorus in action: Biological processes in soil phosphorus cycling*. *Soil biology*, 26, Springer, Heidelberg, 251–244
- NAUTIYAL CS. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 170(1), 265-70.
- NEILANDS, J.B. (1981). Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem*, 50, 715-731.
- OTEINO, N., LALLY, R. D., KIWANUKA, S., LLOYD, A., RYAN, D., GERMAINE, K. J., DOWLING, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6, 745.
- PARK, K.H., LEE, C.Y., SON, H.J. (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Lett Appl Microbiol*, 49(2), 222-8.
- PARK, K.H., LEE, O., JUNG, H., JEONG, J., JEON, Y., HWANG, D., LEE, C., SON, H. (2010). Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 947–955.
- PARK, Y.G., MUN, B.G., KANG, S.M., HUSSAIN, A., SHAHZAD, R., SEO, C.W., ... YUN, B.W. (2017). *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE*, 12(3), e0173203.
- PARKER, C.T., TINDALL, B.J., GARRITY, G.M. (2015). International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*, doi: 10.1099/ijsem.0.000778
- PATI, B.R., CHANDRA, A.K. (1993). Diazotrophic bacterial population and other associated organisms on the phyllosphere of some crop plants. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 148(6), 392–402.

- PAUL, D., SINHA, S.N. (2013). Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of some bacterial strains isolated from thermal power plant effluent exposed water of river Ganga. *CIBTech Journal of Microbiology*,2(3),1-7.
- PAUL, D., SINHA, S.N. (2017). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India, *Annals of Agrarian Science*,15(1),130-136.
- PERSELLO-CARTIEAUX, F., NUSSAUME, L., ROBAGLIA, C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ*, 26, 189–199.
- PIETERSE, C.M., ZAMIOUDIS, C., BERENDSEN, R.L., WELLER, D.M., VAN WEES, S.C., BAKKER, P.A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*,52,347–75.
- PIKOVSKAYA, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- PRAKASH, O., VERMA, M., SHARMA, P., KUMAR, M., KUMARI, K., SINGH, A., KUMARI, H., JIT, S., GUPTA, S.K., KHANNA, M., LAL, R. (2007). Polyphasic approach of bacterial classification — An overview of recent advances. *Indian Journal of Microbiology*, 47(2), 98–108.
- PÉREZ-MIRANDA, S., CABIROL, N., GEORGE-TÉLLEZ, R., ZAMUDIO-RIVERA, L.S., FERNÁNDEZ, F.J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods*,70(1),127-31.
- RATLEDGE, C., DOVER, L.G., (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*, 54, 881–941.
- RAYMOND, K.N., CARRANO, C.J. (1979). Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc Chem Res*,12,183-190.
- RICHARDSON, A.E. (1994). Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst CE, Doubeand BM, Gupta VVSR (eds) *Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Victoria, Australia, 50–62.
- RODRIGUEZ, H., FRAGA, R., GONZALEZ, T., BASHAN, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil*, 287,15–21.

- RODRÍGUEZ, H., FRAGA, R., GONZALEZ, T., BASHAN, Y. (2007). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. In: Velázquez E., Rodríguez-Barrueco C. (eds) First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Developments in Plant and Soil Sciences, 102. Springer, Dordrecht.
- ROSENBLUETH, M., MARTINEZ-ROMERO, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 827–837.
- RUBIO, L.M., LUDDEN, P.W. (2008). Biosynthesis of the iron—Molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annual Review of Microbiology*, 62, 93-111.
- SALAMONE, I. E. G., HYNES, R. K., NELSON, L. M. (2005). “Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria,” in PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Z. A. Siddiqui, Ed., 173–195, Springer, Amsterdam, The Netherlands.
- SANTOYO. G., MORENO-HAGELSIEB, G., OROZCO-MOSQUEDA, M.C., GLICK, B.R. (2006) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res*, 183, 92-9.
- SARWAR, M., FRANKENBERGER, W.T. (1994). Tryptophan dependent biosynthesis of auxins in soil. *Plant Soil*, 160, 97–104
- SCHWAB, A.B., LINDSAY, W.L. (1983). Effect of redox on solubility and availability of iron. *Soil Sci Soc Am J*, 47, 201-205
- SEEFELDT, L.C., HOFFMAN, B.M., DEAN, D.R. (2009). Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 701-722.
- SHABANAMOL, S., DIVYA, K., GEORGE, T.K., RISHAD, K.S., SREEKUMAR, T.S., JISHA, M.S. (2018). Characterization and in planta nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*), *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 46-54.
- SHAHZAD, R., WAQAS, M., KHAN, A.L., AL-HOSNI, K., KANG, S.M., SEO, C.W., LEE I.J. (2017). Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biol Hung*, 68(2), 175-186.
- SHARMA, T., KAUL, S., DHAR, M.K. (2015). Diversity of culturable bacterial endophytes of saffron in Kashmir, India. *Springerplus*, 4, 661.

- SHIM, J., KIM, J.W., SHEA, P.J., OH, B.T. (2015). IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. *J Basic Microbiol*, 55(5), 652-8.
- SONG, X., WU, H., YIN, Z., LIAN, M., YIN, C. (2017). Endophytic Bacteria Isolated from *Panax ginseng* Improves Ginsenoside Accumulation in Adventitious Ginseng Root Molecules, 22(6), pii: E837.
- SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J. (2011). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a001438.
- SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J., REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 425–448.
- SRINIVASAN, M., HOLL, F.B., PETERSEN, D.J. (1996). Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(10), 1006-1014,
- STACKEBRANDT, E., GOEBEL, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 44, 846–849.
- STEPHAN, M.P., OLIVEIRA, M., TEIXEIRA, K.R.S., MARTINEZ-DRETS, G., DÖBEREINER, J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1), 67-72.
- STOREY, S.P., BOGHOZIAN, R., LITTLE, J.L., LOWMAN, D.W., CHAKRABORTY, R. (2006) Characterization of ‘Schizokinen’; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Biometals*, 19, 637-649.
- STUDHOLME, D.J., WASUKIRA, A., PASZKIEWICZ, K., ARITUA, V., THWAITES, R., SMITH, J., GRANT, M. (2014). Draft Genome Sequences of *Xanthomonas sacchari* and Two Banana-Associated Xanthomonads Reveal Insights into the *Xanthomonas* Group 1 Clade. *Genes (Basel)*, 2(4):1050-65.
- TAYLOR, L. (1996). *Maracuja Herbal Secrets of the Rainforest*. Prime publishing inc, Austin.
- TORRES AR, ARAÚJO WL, CURSINO L, HUNGRIA M, PLOTTEGHER F, MOSTASSO FL; AZEVEDO, J.L. (2008). Diversity of endophytic enterobacteria associated with different host plants. *J Microbiol*, 46(4):373-9.

- TOYOTA, K. (2015). Bacillus-related spore formers: Attractive agents for Plant Growth Promotion. *Microbes Environ*, 30(3), 205-7
- TROLOVE, S.N., HEDLEY, M.J., KIRK, G.J.D., BOLAN, N.S., LOGANATHAN, P. (2003). Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Aust J Soil Res*, 41,471–499
- TSAVKELOVA, E.A., KLIMOVA, S.Y., CHERDYNTSEVA, T.A. AND NETRUSOV, A.I. (2006). Hormones and hormone-like substances of microorganisms: A review. *Appl. Biochem. Microbiol*, 42, 229–235.
- VANDEPUTTE, O., ODEN, S., MOL, A., VEREECKE, D., GOETHALS, K., EL JAZIRI, M., PRINSEN, E. (2005). Biosynthesis of auxin by the gram-positive phytopathogen *Rhodococcus fascians* is controlled by compounds specific to infected plant tissues. *Appl Environ Microbiol*, 71, 1169–1177.
- VENDAN, R.T., YU, Y.J., LEE, S.H., RHEE, Y.H. (2010). Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *J Microbiol*, 48(5), 559-65.
- WALITANG, D.I., KIM, K., MADHAIYAN, M., KIM, Y.K., KANG, Y.S.T. (2017) Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiology*, 17, 209.
- WILLIAMS, P.H., CARBONETTI, N.H. (1986). Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*. *Infect Immun*,51(3),942-947.
- WILSON, M.K., ABERGEL, R.J., RAYMOND, K.N., ARCENEUX, J.E., BYERS, B.R. (2006). Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 348(1),320-5.
- WINKELMANN, G., (2002). Microbial siderophores-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans*, 30, 691–695
- WOLTERS, J., ERDMANN, A. (1988.) Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. *Nucleic Acids Res*, 16(Suppl.), r1–r85.
- WYCISZKIEWICZ, M., SAEID, A., CHOJNACKA, K. (2017). In situ solubilization of phosphorus-bearing raw materials by *Bacillus megaterium*. *Eng. Life Sci.*, 17, 749-758.

- XIE, J., SHI, H., DU, Z., WANG, T., LIU, X., CHEN, S. (2016). Comparative genomic and functional analysis reveal conservation of plant growth promoting traits in *Paenibacillus polymyxa* and its closely related species. *Scientific Reports*, 6,21329.
- XIN, K., LI, M., CHEN, C., YANG, X., LI, Q., CHENG, J., ZHANG, L., SHEN, X. (2017). *Paenibacillus qinlingensis* sp. nov., an indole-3-acetic acid-producing bacterium isolated from roots of *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(3),589-595.
- YANG, R., LIU, P., YE, W. (2017). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia* Sect. *Moutan*) roots and leaves. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4),695-705.
- YOUNG, J.P.W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey G, Burris RH, Evans HJ, editors. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall,43-86.
- ZARRAONAINDIA, I., OWENS, S.M., WEISENHORN, P., WEST, K., HAMPTON-MARCELL, J., LAX, S., BOKULICHF, N.A, MILLSF, D.A., MARTING, G., TAGHAVID, S., VAN DER LELIED, D., GILBERT, J.A. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*, 6(2), e02527-14.
- ZHOU, K., BINKLEY, D., DOXTADER, K.G. (1992) A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant Soil*,147,243–250
- ZHU, H., YANG, H. (2015). Isolation and Characterization of a Highly Siderophore Producing *Bacillus subtilis* Strain. In: Zhang TC., Nakajima M. (eds) *Advances in Applied Biotechnology*. Lecture Notes in Electrical Engineering,332, Springer, Berlin, Heidelberg.

Apêndice A. Resultados dos testes fenotípicos relacionados à promoção de crescimento vegetal.

Isolado	Filotipo	NFb	ISF	IPS	AIA(µg/ml)
EP176	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	-	2,75	-	4,81
EP177	<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	-	1,67	3,74
EP178	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	3,20	2,48	3,17
EP179	<i>Bacillus tequilensis</i>	-	2,50	-	3,27
EP180	<i>Bacillus tequilensis</i>	-	2,25	-	1,66
EP181	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	-	3,33	4,02
EP182	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	-	2,42	1,01
EP183	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	2,54	2,3	1,28
EP184	<i>Bacillus megaterium</i>	+	2,14	2,39	3,93
EP185	<i>Bacillus anthracis</i>	+	-	1,25	1,32
EP186	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	2,21	2,41
EP187	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	1,32	-
EP188	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	2,22	2,12	2,38
EP189	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	2,23	1,86	1,35
EP190	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	-	2,1	4,7
EP191	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	1,95	3,9
EP192	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	2,15	1,96	2,1
EP193	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	2,09	1,33
EP194	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	1,48	-
EP195	<i>Bacillus velezensis</i>	+	2,22	1,32	3,81
EP196	<i>Bacillus megaterium</i>	-	2,13	1,98	2,29
EP197	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	-	2,66	1,17
EP198	<i>Bacillus altitudinis</i>	-	2,28	1,54	-
EP199	<i>Bacillus safensis</i>	-	-	-	-
EP200	<i>Pantoea stewartii</i>	-	2,07	2,06	2,77
EP201	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	-	3,33	2,69	3,1
EP202	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	-	1,29	3,65
EP203	<i>Bacillus tequilensis</i>	-	2,33	1,92	-
EP204	<i>Pantoea vagans</i>	-	2,30	1,46	3,39
EP205	<i>Pantoea ananatis</i>	-	2,22	2,86	2,07
EP206	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	-	-	-	-
EP207	<i>Xanthomonas sacchari</i>	-	2,65	2,86	1,28
EP208	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	-	-	-
EP209	<i>Bacillus safensis</i>	-	2,25	-	-
EP210	<i>Bacillus megaterium</i>	-	2,33	1,98	1,59
EP211	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	1,32	2,19
EP212	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	-	2,33	-	5,88

EP213	<i>Bacillus megaterium</i>	+	2,10	2,49	-
EP214	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	-	-	-
EP215	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	-	3,48	3,45	5,14
EP216	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	-	3,20	2,16	3,08
EP217	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	1,56	3,07
EP218	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	2,14	-
EP220	<i>Pseudomonas cichorii</i>	-	3,00	3,36	5,3
EP221	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	2,26	2,18	2,29
EP222	<i>Pantoea ananatis</i>	-	2,70	2,95	3,32
EP223	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	3,53	2,88	2,44
EP224	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	2,2	1,91
EP225	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	2,67	1,46	1,89
EP226	<i>Kosakonia cowanii</i>	-	2,53	1,31	-
EP227	<i>Bacillus safensis</i>	-	-	-	-
EP228	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	2,27	2,68	2,05
EP229	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	2,33	3,06	6,04
EP230	<i>Bacillus safensis</i>	-	-	-	-
EP231	<i>Bacillus aryabhatai</i>	+	-	1,52	5,44
EP233	<i>Bacillus tequilensis</i>	-	-	1,85	1,7
EP234	<i>Bacillus nealsonii</i>	-	2,40	-	4,18
EP235	<i>Bacillus gibsonii</i>	-	-	-	2,99

Apêndice B. Resultados da amplificação dos genes relacionados à promoção de crescimento vegetal.

Isolado	Filotipo	<i>nifH</i>	<i>AcPho</i>	<i>asb</i>	<i>ipdC</i>
EP176	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>				+
EP177	<i>Bacillus aryabhatai</i>				
EP178	<i>Pseudomonas sp.</i>				
EP179	<i>Bacillus tequilensis</i>				+
EP180	<i>Bacillus tequilensis</i>		+		+
EP181	<i>Bacillus aryabhatai</i>		+		+
EP182	<i>Bacillus tequilensis</i>				
EP183	<i>Bacillus tequilensis</i>				+
EP184	<i>Bacillus megaterium</i>				
EP185	<i>Bacillus anthracis</i>		+	+	+
EP186	<i>Bacillus megaterium</i>				
EP187	<i>Bacillus velezensis</i>				
EP188	<i>Bacillus aryabhatai</i>				+
EP189	<i>Bacillus aryabhatai</i>		+		+
EP190	<i>Bacillus aryabhatai</i>		+		
EP191	<i>Bacillus megaterium</i>				
EP192	<i>Bacillus aryabhatai</i>				
EP193	<i>Bacillus megaterium</i>		+		
EP194	<i>Bacillus velezensis</i>				
EP195	<i>Bacillus velezensis</i>				+
EP196	<i>Bacillus megaterium</i>				
EP197	<i>Bacillus tequilensis</i>				
EP198	<i>Bacillus altitudinis</i>				
EP199	<i>Bacillus safensis</i>				
EP200	<i>Pantoea stewartii</i>				
EP201	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>				
EP202	<i>Bacillus thuringiensis</i>		+	+	+
EP203	<i>Bacillus tequilensis</i>				
EP204	<i>Pantoea vagans</i>				
EP205	<i>Pantoea ananatis</i>				
EP206	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>				
EP207	<i>Xanthomonas sacchari</i>				
EP208	<i>Rhodococcus erythropolis</i>				
EP209	<i>Bacillus safensis</i>				
EP210	<i>Bacillus megaterium</i>				
EP211	<i>Bacillus megaterium</i>				
EP212	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>				

EP213	<i>Bacillus megaterium</i>			
EP214	<i>Bacillus thuringiensis</i>		+	+
EP215	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>			
EP216	<i>Leclercia adecarboxylata</i>			
EP217	<i>Bacillus velezensis</i>			
EP218	<i>Bacillus cereus</i>		+	+
EP220	<i>Pseudomonas cichorii</i>	+		
EP221	<i>Bacillus aryabhatai</i>			+
EP222	<i>Pantoea ananatis</i>			
EP223	<i>Pseudomonas sp.</i>			
EP224	<i>Bacillus megaterium</i>			
EP225	<i>Rhodococcus erythropolis</i>			+
EP226	<i>Kosakonia cowanii</i>			
EP227	<i>Bacillus safensis</i>			
EP228	<i>Bacillus aryabhatai</i>			
EP229	<i>Bacillus aryabhatai</i>			
EP230	<i>Bacillus safensis</i>			
EP231	<i>Bacillus aryabhatai</i>			+
EP233	<i>Bacillus tequilensis</i>			+
EP234	<i>Bacillus nealsonii</i>			
EP235	<i>Bacillus gibsonii</i>			

ANEXOS



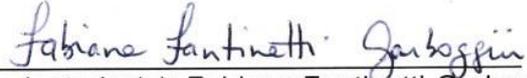
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 INSTITUTO DE BIOLOGIA
 Universidade Estadual de Campinas
 Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
 Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "*Diversidade bacteriana endofítica cultivável de Passiflora incarnata e seu potencial biotecnológico*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
 Nome do(a) aluno(a): Luis Gabriel Cueva Yesquén

Assinatura: 
 Nome do(a) orientador(a): Fabiana Fantinatti-Garbognini

Data: 07/07/2017

Dra. Fabiana Fantinatti Garbognini
 Divisão de Recursos Microbianos
 CPQBA - UNICAMP
 CRB 31738/01-D

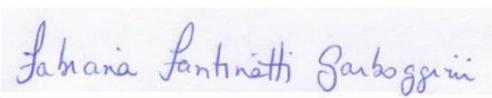
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Passiflora incarnata* e seu potencial na promoção de crescimento vegetal** não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 09/09/2018

Assinatura: 

Nome do(a) autor(a): Luis Gabriel Cueva Yesquén

Assinatura: 

Nome do(a) orientador(a): Fabiana Fantinatti-Garboggini

RG nº 16.973.966-1